Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Isolierung und Charakterisierung von zwei bisher unbekannten Pigment-Farbstoffen des Kawa-Rhizoms

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Bähr
aus
Stutzhaus/Thür.

1962

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Isolierung und Charakterisierung von zwei bisher unbekannten Pigment-Farbstoffen des Kawa-Rhizoms

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Bähr
aus
Stutzhaus/Thür.

Referent: Professor Dr. R. Hänsel

Korreferent: Professor Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 12. 1962

Tag der Promotion:

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen Eltern in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. R. H ä n s e l durchgeführt. Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. R. H ä n s e l , für sein großes Wohlwollen und die Förderung meiner Arbeit zu danken.

Herrn Professor Dr. G. S c h e n c k , Direktor des Pharmazeutischen Institutes der Freien Universität Berlin, möchte ich ebenfalls meinen herzlichen Dank aussprechen, besonders für die Möglichkeit, einige Geräte im dortigen Laboratorium benutzen sowie die dortige Bibliothek aufsuchen zu dürfen.

Ferner danke ich recht herzlich Frau Dr. L. L a n g h a m m e r für ihre wertvollen Hinweise sowie für anregende Diskussionen.

Schließlich möchte ich der Firma S c h e r i n g A.G., Berlin, insbesondere Herrn Diplom-Chemiker J. H u b e r , Leiter des analytischen Kontroll-Laboratoriums, für seine Mithilfe bei der Durchführung zahlreicher Mikro-Analysen danken. Dem Direktor des Organisch-Chemischen Institutes der Technischen Universität Berlin, Herrn Professor Dr. F. B o h l m a n n, gilt mein Dank für die Aufnahme einiger IR-Spektren.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung . . . . . Seite 5
1) Zur Botanik von Piper methysticum FORST. 6
2) Geschichtliches über die Kawa-Droge . . . 9
3) Übersicht über die bisher durchgeführten Untersuchungen 11
a) Phytochemische Untersuchungen 11
b) Pharmakologische Untersuchungen . . . 14

B. Hauptteil 17
1) Isolierung der bekannten Kawa-Inhaltsstoffe (Methysticin, Yangonin, Kawain, Dihydrokawain und Dihydromethysticin) durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd 17
2) Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Kawa-Extraktes 20
3) Isolierung der beiden Substanzen A und B und von Desmethoxy-Yangonin 27
a) Isolierung eines Mischkristallisates AB. 27
b) Isolierung von Desmethoxy-Yangonin . . 28
c) Auftrennung des Stoffgemisches AB an Silikagel G MERCK 28
4) Charakterisierung von Flavokawin A . . . 31
5) Versuche zur Konstitutionsermittlung von Flavokawin A. 34
a) UV-Spektrum 34
b) Zyklisierung zum Flavanon 34
c) Alkalispaltung 37
d) Infrarotspektroskopische Untersuchungen von Flavokawin A 38
6) Bisher durchgeführte Untersuchungen zur Charakterisierung von Flavokawin B. . . . 45

Seite

a) Infrarotspektroskopische Untersuchung von Flavokawin B 48
7) Zur Biogenese der C_6-C_3-C_6-Körper . . . 51
8) Übersicht über einige Chalkone mit drei Methoxylgruppen und der Summenformel $C_{18}H_{18}O_5$ 58
9) Pharmakologische Untersuchungen 62

C. Zusammenfassung 63
D. Experimenteller Teil 64

Lebenslauf 85

A. E I N L E I T U N G .

Das 2o. Jahrhundert stellt durch seine politische Entwicklung und seine technischen Fortschritte immer größere Anforderungen an den Menschen. Durch die pausenlos auf ihn einwirkenden Reize kommt es teilweise zu einer Überbeanspruchung des psychischen Gleichgewichtes, die der Mensch durch sedativ wirkende Arzneimittel auszugleichen versucht. Der Arzneimittelmarkt zeigt ein überaus großes Angebot an Schlaf- und Beruhigungsmitteln, jedoch erst die in neuerer Zeit in die Therapie eingeführten sog. Tranquilizer oder Ataraktika scheinen diesem Problem eher gerecht zu werden, da sie eine speziell psychische Beruhigung bewirken. Da diese Stoffe fast ausschließlich auf synthetischem Wege gewonnen werden, ergibt sich die Frage, ob nicht ähnlich wirkende Substanzen auch in Drogen anzutreffen sind. Wir finden solche zentralsedativ wirkenden Bestandteile in der Rauwolfia-Wurzel. Ferner werden Baldrian, Hopfen, Passiflora, Melisse und Avena sativa - wenn auch wesentlich schwächer in ihrer Wirksamkeit - als Sedativa in der Medizin verwendet. Eine Pflanze, die neuerdings wegen ihrer sedativen Eigenschaften wieder in den Blickpunkt des Interesses tritt, ist Piper methysticum oder das Rhizom von Kawa-Kawa.

1. ZUR BOTANIK VON PIPER METHYSTICUM .

Piper methysticum FORST. gehört zur Familie der Piperaceae, die wiederum ein Glied der zu den Dykotylen gehörenden Ordnung Piperales ist[1].

Die Gattung Piper umfaßt über 700 Arten[2]. Piper methysticum wird zur Untergattung Eupiper C.D.C., Sektion Oligandropiper Engl., gerechnet[3].

Piper methysticum ist eine 1,5 - 4,5 m hohe perennierende Pflanze. Sie besitzt ein Rhizom, das verdickt und mit zahlreichen, dünnen Nebenwurzeln versehen ist.

Die Sproßachsen entspringen dem Wurzelstock und sind im jungen Zustand verzweigt. Später fallen die Seitenzweige ab, so daß der oberirdische Teil der Pflanze aus einer Anzahl unverzweigter Stämme besteht, die getrennt zu sein scheinen, jedoch einer gemeinsamen Basis entspringen.

Die grünen, zuweilen rötlichen Blätter sind wechselständig angeordnet, gestielt und mit Stipeln versehen. Ihre Spreite ist herzförmig-oval, die Nervatur handförmig.

Die Blüten sind diözisch, weibliche Exemplare werden heute nicht mehr beobachtet. Die Infloreszenz stellt eine Ähre dar.

Die Pflanze findet sich in Polynesien, Mikronesien, Melanesien, auf den Hawaii-Inseln und in Teilen

---

1) R.WETTSTEIN, Handbuch der System.Botanik,S.638-639. Franz Deuticke, Leipzig u.Wien 1935.

2) G.H.M.LAWRENCE, Taxonomy of Vascular Plants,S.445. The MacMillan Company, New York, 1951.

3) A.ENGLER, in Engler-Prantl, Die natürl.Pflanzenfamilien Abtlg. III/1. 1894

Neu-Guineas. Ihr Ursprung liegt im Westen des Verbreitungsgebietes, doch ist die genaue Herkunft nicht bekannt. Die Ausbreitung nach Osten erfolgte durch den Menschen[1].

Die Art ist heute nur in Kultur bekannt[2] und es lassen sich verschiedene Sorten unterscheiden. BROWN[3] nennt 21 "varieties", die von den Eingeborenen kultiviert werden und sich in Wuchshöhe, Länge und Farbe der Internodien usw. unterscheiden. Der Autor erwähnt, daß zum Teil beträchtliche Unterschiede bezüglich der Wirkungsintensität existieren.

Die folgende Abbildung haben wir aus dem Werk:

"Icones selectae plantarum"
Vol. III, 1837 Tab. 89

entnommen. Sie gilt als die erste Zeichnung, die von Piper methysticum FORST. in Europa veröffentlicht wurde.

---

1) T.G.YUNCKER, Brittonia 10, 1.-7. (1958)
2) T.G.YUNCKER, Occas.Papers Bernice, P.Bishop Mus. 22(8), 83-108, Illus.1959
3) F.B.H.BROWN, Bishop Mus.Bull.130, 16-20 (1935)

Abb. 1 **PIPER** methysticum. *Forst.*

2. Geschichtliches über die Kawadroge.

Ende des 18. Jahrhunderts wurde Piper methysticum durch den berühmten britischen Seefahrer James COOK erstmalig den Europäern bekannt. COOK und seine Begleiter beobachteten, daß die Eingeborenen auf Hawaii bei ihren Festen aus den Wurzelstöcken der Kawa einen Trank bereiteten, der eine beruhigende Wirkung ausübte.

Jedoch ist uns bekannt, daß der Kawatrank auf zwei verschiedene Arten hergestellt werden kann und daß von der unterschiedlichen Zubereitung auch eine unterschiedliche Wirkungsweise abhängt.

Entweder werden die Wurzelstöcke des Kawastrauches gründlich im Munde zerkaut und dieser mit Speichel durchsetzte Wurzelbrei in Schalen mit Kokosmilch oder Wasser gesammelt und von festen, unlöslichen Bestandteilen getrennt, oder aber der Wurzelstock wird zwischen Steinen zerkleinert und mit Wasser mazeriert.

Man beobachtet allgemein bei der ersteren Herstellungsart eine wesentlich stärkere, sedative Wirkung des Trankes, wobei vermutlich der Einfluß der Speichelfermente auf die Droge eine nicht unwesentliche Rolle spielt.

In früheren Zeiten stellte man den Kawatrank fast ausschließlich nach der " Kaumethode " her. Meist waren religiöse Feste oder die Bewirtung von Gästen der Anlaß, Kawa zu trinken und nur den Männern war es gestattet, an diesen " Trinkgesellschaften " teilzunehmen. Frauen und Kinder durften zwar das Getränk zubereiten, selbst an den Trinkgelagen teilzunehmen war ihnen jedoch nicht gestattet.

Heute bereiten die Eingeborenen das Getränk hauptsächlich nach der Mazerationsmethode, wodurch die sedative Wirkung des Trankes wesentlich herabgesetzt wird. Auch von dem Verbot für Frauen, Kawa zu trinken, ist jetzt nichts mehr bekannt. Im Gegenteil, gerade bei ihnen kann man heute häufig beobachten, daß sie Kawa trinken, weil sie dadurch schwere Arbeiten leichter verrichten können und auch durch die oft unerträgliche Hitze des Landes weniger beeinträchtigt werden. Häufig reicht man das Getränk auch Kranken, weil man an eine kräftigende und anregende Wirkung der

Kawa glaubt. Schließlich sei noch erwähnt, daß man unter den Trinkern recht oft schwangere Frauen findet, da sie annehmen, daß der Kawatrank den Geburtsvorgang für sie erleichtert und die Milchbildung fördert.

In einer Beschreibung über die Anwendung des Getränkes berichtet uns L.LEWIN in seinem Werk " Phantastika "[1] folgendes:

" Das Kawatrinken bildet oft die Einleitung zu einem Feste. Das Pflanzen von Bäumen z.B. wird durch ein Kawagelage gefeiert. Bei Palavers mit anderen Stämmen, bei Besprechung öffentlicher Angelegenheiten, bei geselligen Zusammenkünften, zur Bewirtung fremder, als Genußmittel, um sich in eine angenehme Stimmung zu versetzen und schließlich als ein schmerzbetäubendes, Ruhe für den kranken und ermatteten Körper schaffendes Medikament wird die Kawa getrunken. Auf einzelnen Inseln bildet sie ein so regelmäßiges Getränk wie unser Kaffee und Tee. Das Aussehen der Kawa ähnelt dem eines Kaffeeaufgusses mit Milch. Es ist schmutzig graubraun oder grauweiß, zumal beim Umschütteln, wenn der feinste graugelbe, durch die von den Insulanern geübte Filtration nicht zu entfernende Wurzeldetritus in der Flüssigkeit verteilt ist. Ist wenig von diesem Detritus vorhanden oder wird die Kawa nach dem Absetzen des Niederschlages in der Schale ausgeschöpft, so hat sie ein mehr lichtbraunes oder dunkelbraunes Aussehen. Der Geschmack des Kawagetränkes ist ebenfalls je nach der Behandlungsart verschieden. Er ist fade oder streng, bitter aromatisch und beißend, seifenartig oder adstringierend. Die Ursache der Geschmacksdifferenz liegt in der Abtrennung der im Wasser unlöslichen Wurzelteile von dem Kawagetränk. Letzteres enthält sehr geringe Mengen der wirksamen, schmeckenden Substanzen gelöst. Vor allem kommt die Anwesenheit von Harzen in Frage. In um so größerem Maße diese vorhanden sind und in den Mund gelangen, um so intensiver wird auch der Geschmack sein. Eine Gewöhnung an den eigenartigen Geschmack scheint nicht stattzufinden, denn COOK sah, wie die Insulaner sie nicht ohne saure Gesichter nahmen und sich nachher schüttelten."

---

1) L.LEWIN, Phantastika, Georg Stilbe, Berlin 1927

3. Übersicht über die bisher durchgeführten Untersuchungen.

a) Phytochemische Untersuchungen.

Seit der Mitte des vorigen Jahrhunderts begann man, sich für die Inhaltsstoffe des Rauschpfeffers zu interessieren und versuchte die Wirkungen des Kawatrankes genauer zu prüfen.

Die ersten Untersuchungen dieser Art wurden von GOBLEY und O'RORKE [1,2] im Jahre 1850 durchgeführt. Sie fanden in der Pflanze zunächst nur ubiquitäre Bestandteile wie Stärke und Oxalsäure, ferner geringe Mengen Methysticin. Wesentlich genauer wurde die Droge von LEWIN[3] untersucht. Er isolierte aus Piper methysticum zwei Harze, die er als α- und ß-Harze bezeichnete. Er konnte bei diesen Harzen bereits anästhesierende Wirkungen nachweisen. Weitere Untersuchungen über das Kawarhizom folgten. Sie sind veröffentlicht in den Berichten von D.E.NOLTING UND H.KOPP[4] über das Yangonin, in

---

1) N.T.GOBLEY u. M.O'RORKE, J. Pharmac.Chim.1850,550

2) N.T.GOBLEY u. M.O'RORKE, C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 50, 598 (1859)

3) L.LEWIN, Piper methysticum, Monographie, Berlin 1886

4) D.E.NOLTING u. H.KOPP, Le Monit.sci. 1874, S.920

den Arbeiten von C.POMERANZ[1] über das chemische Verhalten von Methysticin und schließlich von E. WINZHEIMER[2] über Yangonin und Methysticin.

Am bedeutendsten sind die Untersuchungen über den Rauschpfeffer von W.BORSCHE und Mitarbeitern[3]. In ihren umfangreichen Arbeiten, die in die Zeit von 1913 - 1933 fallen, konnten sie zunächst einmal die früheren Veröffentlichungen über die Untersuchungen des Piper methysticum bestätigen. Ferner gelang es ihnen, zwei neue Inhaltsstoffe aus der Pflanze zu isolieren: das Kawain und Dihydrokawain.

Im Jahre 1939 berichtet VAN VEEN[4] über einen neuen Inhaltsstoff aus Kawà-Kawa. Er isoliert ihn aus den Stengelteilen der Pflanze und nennt ihn Marindin. Später stellt sich heraus, daß Marindin mit dem von BORSCHE isolierten Dihydrokawain identisch ist.

In neuerer Zeit gelang es R.HÄNSEL und H.U. BEIERSDORFF[5] mit Hilfe säulenchromatographischer Methoden erstmalig einheitliches Dihydromethysticin aus dem Rhizom zu isolieren.

---

1) C.POMERANZ, Mh.Chem. 9, 863 (1888)
10, 783 (1889)

2) E.WINZHEIMER, Arch. Pharmac. 246, 338 (1908)

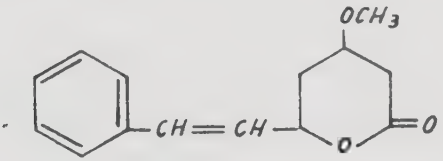
3) W.BORSCHE u.Mitarbeiter, Ber. dtsch. chem. Ges.
47, 2902 (1914) ; 54, 2229 (1921);
60, 982, 1135, 2112 (1927) ;
62, 360, 368, 2515 (1929) ;
63, 2414 (1930) ;
65, 820 (1932) ; 66, 803 (1933).

4) A.G.v.VEEN, Geneeskund.Tijdschr.Nederl.-Indie.78, 1941 (1938)
A.G.v.VEEN, Recueil.Trav.chim.Pays-Bas,58, 521 (1939)

5) R.HÄNSEL u.H.U.BEIERSDORFF, Naturwissenschaften 45, 573 (1958)

Eine neue, bisher noch unbekannte Substanz aus dem Kawarhizom wurde im RIKER-LABORATORIUM, Los Angeles,[1] gefunden. Der neue Stoff konnte als Desmethoxy-Yangonin identifiziert werden.

Bis heute sind also sechs charakteristische Kawabestandteile bekannt: Yangonin, Methysticin, Dihydromethysticin, Kawain, Dihydrokawain und Desmethoxy-Yangonin. Alle diese Bestandteile haben in ihrem Molekül dasselbe Grundgerüst: einen Benzolring, der durch eine C = C - Brücke mit einem 6-gliedrigen Pyronring verbunden ist.



Man kann also alle Kawa-Inhaltsstoffe als 6-styryl-α-pyrone auffassen. Der Unterschied wird durch die Art der Substitution am Benzolring bestimmt, bzw. durch die Anzahl der Doppelbindungen im Molekül. Die Doppelbindungen spielen die wesentliche Rolle bei der pharmakologischen Wirksamkeit, d.h. die sedative Wirkung hängt vom Hydrierungsgrad ab.

---

1) M.W.KLOHS, F.KELLER, R.E.WILLIAMS, I.M.TOEKES, u. G.E.CRONHEIM, J.med.pharmac.Chem. 1, 95 (1959)

b) Pharmakologische Untersuchungen.

Es wäre unvollständig, wollte man an dieser Stelle nicht auch auf einige Untersuchungen hinweisen, die auf pharmakologischem Gebiet mit den Kawastoffen durchgeführt wurden.

Bereits K.SCHÜBEL[1] beobachtete eine lähmende Beeinflussung des Zentralnervensystems bei Mäusen, Tauben und Fröschen, denen er eine alkoholische Kawaharzlösung injizierte. Diese nur mit dem Kawaharz durchgeführten Versuche waren wenig befriedigend, da sie keinen Rückschluß auf die Wirkung der Reinsubstanzen zuließen.

VAN VEEN[2] war der erste, der die gesamte sedative Wirkung der Droge dem Dihydrokawain zuschrieb, da er dessen schlafmachende Aktivität durch Tierversuche an Affen und Tauben bestimmen konnte.

Dieses Ergebnis veranlaßten R.HÄNSEL und H.U.BEIERSDORFF[3], die Frage nach der pharmakologischen Wirkung von Dihydromethysticin zu stellen, und zwar auf Grund der Überlegung, daß die sedative Wirkung bei diesen strukturell ähnlich gebauten Stoffen vom Hydrierungsgrad abhängig sein könnte. Diese Untersuchungen führten zur Isolierung von reinem Dihydromethysticin aus der Droge und zu der Feststellung, daß Dihydromethysticin wesentlich stärker wirksam ist als Dihydrokawain. Somit war es also den genannten Autoren gelungen, einen zweiten Bestandteil aus Piper methysticum zu isolieren, der eine sedative Wirkung hat.

---

1) K.SCHÜBEL, Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol. Pharmakol. 102, 250 (1924)

2) A.G.v.VEEN, Geneeskund.Tijdschr.Nederl.-Indie.78, 1941 (1938)

3) R.HÄNSEL u.H.U.BEIERSDORFF, Arzneimittelforsch.9, 581 (1959)

Das RIKER-LABORATORIUM[1], Los Angeles, bestätigte dieses Ergebnis, stellte jedoch fest, daß ein Chloroformextrakt aus der Droge, aus dem sie ihrerseits Dihydromethysticin isoliert hatten, wesentlich stärkere sedative Eigenschaften aufweist als Dihydromethysticin und Dihydrokawain in gleicher Konzentration.

Nun ist ja bekannt, daß Gesamtextrakte von Arzneidrogen sehr oft eine andere pharmakologische Wirksamkeit entfalten als seine Einzelkomponenten. Dies kann natürlich die verschiedensten Ursachen haben: Öfters zeigen derartige Extrakte schwankende Wirksamkeit, die sich - abgesehen vom Wirkstoffgehalt - dahin erklären läßt, daß die Einzelkomponenten z.T. verschiedene pharmakodynamische Wirkungen haben und das quantitative Verhältnis dieser Komponenten in der Pflanze - physiologisch bedingt - nicht konstant ist.

Andererseits kann durch Synergismus der Einzelkomponenten eine Verstärkung der Wirkung einsetzen, wobei auch vielfach ubiquitär vorkommende Pflanzeninhaltsstoffe insofern eine Rolle spielen können, als sie die Resorption erleichtern. Z.B. hat das Rauwolfia-Alkaloid Reserpin nur eine schwach antihypertonische Wirkung, während der Gesamtextrakt der Droge eine rasche Blutdrucksenkung von mehrstündiger Dauer bewirkt.

Es wäre also denkbar, daß der Chloroformextrakt aus dem Kawarhizom noch bisher unbekannte Inhaltsstoffe enthält, die möglicherweise die sedative Wirkung synergistisch verstärken.

---

1) M.W.KLOHS, F.KELLER, R.E.WILLIAMS, M.I.TOEKES u. G.E.CRONHEIM, J.med.pharmac.Chem. 1, 95 (1959).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Droge, insbesondere einen Chloroformextrakt, erneut zu untersuchen. Wir stellten uns zunächst die Aufgabe, eine analytische Methode zu entwickeln. In der Literatur liegen hierüber bisher keine Angaben vor.

Des weiteren wollten wir eine Isolierung bisher unbekannter Inhaltsstoffe versuchen.

B. H A U P T T E I L .

1. Isolierung der bekannten Kawa-Inhaltsstoffe durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxyd.

Für unsere analytischen Untersuchungen war es wichtig, die bereits bekannten Inhaltsstoffe erneut zu isolieren, um auf diese Weise Vergleichssubstanzen zur Identifizierung zu gewinnen.

Es lag uns wenig daran, die älteren, teilweise sehr umständlichen und zeitraubenden Methoden zur Gewinnung der Inhaltsstoffe zu reproduzieren. Wir wandten uns daher einer vereinfachten und verbesserten Isolierungsmethode für Kawain, Dihydrokawain und Dihydromethysticin zu, die von R.HÄNSEL und H.U.BEIERSDORFF[1] mit Hilfe der Säulenchromatographie durchgeführt worden war.

Wir gingen zunächst von den bekannten Versuchsbedingungen aus und stellten uns aus handelsüblichem Kawawurzelpulver im Soxhlet einen Ätherauszug her. Nach beendeter Extraktion hatten sich Yangonin und Methysticin in Form großer Kristallklumpen am Boden des Gefäßes abgesetzt. Die überstehende Flüssigkeit wurde dekantiert und das Yangonin-Methysticin-Gemisch mit Methanol durch fraktionierte Kristallisation getrennt.

Reines Methysticin wurde durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol gewonnen.

Seidenglänzende, weiße Nadeln. Schm. 137°C.

Durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Essigester konnten wir reines Yangonin gewinnen.

---

1) R.HÄNSEL u.H.U.BEIERSDORFF, Naturwissenschaften 45, 573 (1958)

Opalisierende, säulenförmige Kristalle. Schmp. 154°C.

Der dekantierte Ätherextrakt, der hauptsächlich Kawain, Dihydrokawain und Dihydromethysticin enthält, wurde zur Isolierung der Stoffe über neutrales Aluminiumoxyd MERCK (Aktivitätsstufe II - III) gegeben. Während Dihydromethysticin am Aluminiumoxyd adsorbiert wurde, lassen sich Dihydrokawain und Kawain mit Äther leicht eluieren und später durch fraktionierte Kristallisation gewinnen. Kawain wird dann in Form weißer, seidenglänzender Nadeln vom Schmp.107 - 108°C erhalten.

Dihydrokawain hat einen Schmp. 58 - 60°C und kristallisiert in weißen Prismen.

BEIERSDORFF[1] weist ausdrücklich bei seinen Versuchen daraufhin, daß die Aktivitätsstufe des verwendeten Aluminiumoxyds bei II - III liegen muß. Durch den wasserhaltigen Ätherextrakt wird dann das Aluminiumoxyd weiter desaktiviert, so daß schließlich die Aktivitätsstufe IV vorliegt. Dadurch wird eine Auftrennung an der Säule erst möglich. Modellversuche, die mit Mischungen von Reinsubstanzen - entsprechend dem Vorkommen in der Pflanze dosiert - in wasserfreiem Äther durchgeführt wurden, hatten ergeben, daß sowohl Dihydromethysticin als auch Kawain und Dihydrokawain fest an der Säule haften bleiben, wenn als Adsorptionsmittel Aluminiumoxyd der Aktivität II - III verwendet wurde. Sie ließen sich mit wasserfreiem Äther kaum oder nur schwer eluieren.

Auch die Trennung des Gemisches Kawain und Dihydrokawain gelingt nicht immer ohne Schwierigkeiten, da beide Laktone oft gemeinsam auskristallisieren. Die fraktionierte Kristallisation muß daher besonders sorgfältig durchgeführt werden.

1) R.HÄNSEL u.H.U.BEIERSDORFF, Arzneimittelforsch. 9, 581 - 585 (1959)

Zur Gewinnung des Dihydromethysticin zerlegten wir die Aluminiumoxydsäule. Dihydromethysticin wurde als gelbgefärbte Zone vom Aluminiumoxyd adsorbiert, die sich beim Tüpfeln mit konz. H_2SO_4 infolge einer karmesinroten Färbung leicht lokalisieren ließ. Diese Zone wurde mit Alkohol mehrere Stunden extrahiert und der Extrakt anschließend i.V. eingeengt. Den Rückstand versetzten wir mit Äther und ließen im Eisschrank auskristallisieren. Nach mehreren Stunden hatte sich ein Kristallbrei gebildet, der nach genauer Überprüfung neben Dihydromethysticin noch Yangonin und Methysticin enthielt. Durch fraktionierte Kristallisation konnten Yangonin und Methysticin abgetrennt werden. Nach weiterem Einengen des Lösungsmittels wurde schließlich Dihydromethysticin gewonnen, das aus Methanol mit Aktivkohle umkristallisiert wurde. Weiße derbe Prismen. Schmp. 117 - 118°C.

2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen des Kawaextraktes.

Zur Entwicklung einer raschen analytischen Methode, versuchten wir zunächst ein papierchromatographisches Verfahren zu entwickeln.

Nun besteht natürlich von vornherein eine gewisse Schwierigkeit, lipophile Stoffgemische papierchromatographisch zu trennen und es bedarf schon einiger Erfahrung, für die Trennung dieser Stoffe Laufmittelsysteme zu finden, die brauchbare Resultate liefern. Geeignet schien uns hierzu nur das sog. Inverted-Phase-Verfahren, d.h. es werden Chromatographierpapiere verwendet, bei denen das sonst an ihrer Oberfläche adsorbierte Wasser als stationäre Phase ausgeschaltet ist. Wir versuchten daher den Chloroformextrakt auf azetyliertem Chromatographierpapier[+] aufzutrennen. (Laufmittel: n-Propanol : Wasser 50 : 50). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren wenig befriedigend und die Auftrennung des Stoffgemisches gelang nur sehr unvollständig. Auch Änderungen der Versuchsbedingungen ergaben keine befriedigenden Ergebnisse. Beim Betrachten des Chromatogrammes im kurzwelligen UV-Licht ($E_{max.}$ 260 mμ) fiel jedoch deutlich ein dunkler Fleck auf, der sich nahe der Lösungsmittelfront im R_f-Bereich 0,9 befand. Durch das Mitlaufenlassen von Reinsubstanzen ließ sich dieser dunkle Fleck mit den bisher bekannten Kawa-Inhaltsstoffen nicht in Zusammenhang bringen.

Wir wandten uns daher einer neuen chromatographischen Methode zu, die von E.STAHL[1] in jüngster Zeit entwickelt worden war, und die durch ihre

---

+) Verwendet wurde Chromatographierpapier Nr.2043b der Fa.SCHLEICHER u.SCHÜLL

1) E.STAHL, Pharmazie, 11, 633 (1956), Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958), Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 292./64.,411 (1959), Pharmaz.Rdsch.2, 1-6 (1959).

nahezu universelle Anwendungsmöglichkeit besticht: die Dünnschichtchromatographie.

Sie beruht auf dem Prinzip, gelöste Stoffe mehr oder weniger fest auf hochaktiven Adsorptionsschichten - in unserem Falle Kieselgel G MERCK - zu binden. Dabei handelt es sich um keine Bindung im chemischen Sinne, sondern ausschließlich um Adsorption, die dadurch gekennzeichnet ist, daß mit geeigneten Lösungsmitteln das adsorbierte Molekül vom Träger unverändert wieder gelöst werden kann.

Man kann die Dünnschichtchromatographie auf die Beobachtungen des russischen Botanikers TSWETT zurückführen, der erstmalig Farbstofflösungen an Säulen farbloser Absorbentien auftrennte. Später wurde diese Methode von R.KUHN, A.WINTERSTEIN und L.ZECHMEISTER[1] wieder aufgegriffen und zu einem modernen adsorptionschromatographischen Trennverfahren ausgearbeitet, das durch die Einführung eines standardisierten Aluminiumoxyds (H.BROCKMANN[2]) eine wesentliche Verbesserung erfuhr.

Eine Schwierigkeit dieser Absorptionschromatographie an Säulen besteht aber in der Auftrennung kleinster Mengen sowie in der Auftrennung und Sichtbarmachung farbloser, nicht fluoreszierender Verbindungen. Deshalb versuchte man einen Übergang zur "offenen Säule".

Mehrere Versuche wurden in den letzten Jahren in dieser Richtung unternommen. Zunächst glaubte man eine Lösung darin gefunden zu haben, wenn man mit Aluminiumoxyd oder Kieselsäure imprägnierten Papieren arbeite, jedoch blieb auch hier der erhoffte Erfolg aus. KIRCHNER und Mitarbeiter[3] verwendeten Glasplatten, auf die sie

---

1) L.ZECHMEISTER u.L.v.CHOLNOKY, Die chromatographische Adsorptionsmethode, 2.Aufl., Wien, Springer 1938.

2) H.BROCKMANN, Angew.Chem. 53, 384 (1940)
Chem.Ber. 74, 73 (1956)

3) J.G.KIRCHNER, J.M.MILLER u.G.J.KELLER, Analytic Chem. 23, 420 (1951)
J.G.KIRCHNER u.G.J.KELLER, J.Amer.chem.Soc. 72, 1867 (1950)

ein mit Stärkekleister vermischtes Adsorptionsmittel auftrugen. Nach einer Methode von H.LAGONI und A.WORTMANN[1] wird einfach Aluminiumoxyd ohne ein Bindemittel auf Glasplatten aufgestreut und nach der Art der "Rutterschen Rundfiltertechnik" gearbeitet[2].

Als weiterer Fortschritt auf diesem Gebiet sei schließlich noch die Ringchromatographie nach L.H.BRYANT[3] erwähnt, der als Adsorptionsmittel festhaftende Stärkeschichten verwendet.

Alle bisher aufgeführten Methoden scheiterten letzten Endes an einer umständlichen Zubereitung der Streichmasse, sowie hauptsächlich an der Unmöglichkeit, gleichmäßige Schichtdicken aufzutragen, wodurch eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Frage gestellt wurde.

Bei der dünnschichtchromatographischen Methode nach STAHL sind diese eben aufgeführten Mängel weitgehend ausgeschaltet und durch die Verwendung standardisierter Adsorbentien ist eine verhältnismäßig gute Reproduzierbarkeit der Trennergebnisse gesichert.

Zur Herstellung der Adsorptionsplatten nach STAHL verwendet man hochaktive Stoffe wie Kieselgel, Kieselgur, Aluminiumoxyd u.a. und bedient sich einer mechanischen Vorrichtung, die es gestattet, ca. 250 mμ dicke Trennschichten auf die Platten aufzutragen. Diese Trennschichten bilden dann das eigentliche Chromatographie-Medium. Trennt man nun Stoffgemische nach dieser Methode auf, so kann man im allgemeinen beobachten, daß die einzelnen Substanzen nach ihrer Polarität gegliedert im Chromatogramm erscheinen.

Hinsichtlich der Sichtbarmachung der Flecke farbloser Substanzgemische besitzt die Dünnschichtchromatographie wesentliche Vorteile gegenüber der Papierchromatographie: die Verwendung aggressiv wirkender Sprühreagenzien und das Erhitzen der Platten bis zum Verkohlen der Substanzflecke[4]. Auch die ziemlich kurzen Entwicklungszeiten - sie schwanken zwischen 15 - 30 Min. - wirken sich hier im Vergleich zur Papierchromatographie recht günstig aus.

---

1) H.L.LAGONI u.A.WORTMANN, Milchwissenschaft, 10, 363 (1955)

2) L.RUTTER, Nature (London), 161, 435 (1948)

3) L.H.BRYANT, Nature (London), 175, 556 (1955)

4) E.STAHL, Angew.Chemie, 73, 19 (1961)

Bei unseren Versuchen wurden durchweg 0,1%ige Kawaextraktlösungen in Chloroform mit Pipetten auf vorbereitete Platten aufgetragen und die Entwicklung in luftdicht schließenden Gefäßen durchgeführt.

Um einen Überblick über die Wanderungsgeschwindigkeit bzw. die Adsorption der zu untersuchenden Stoffe an den Kieselgelschichten zu bekommen, wurde zunächst mit reinen Lösungsmitteln nach der eluotropen Reihe chromatographiert. Dabei zeigte sich, daß die Extraktlösungen bei der Entwicklung mit Petroläther, Benzin, Hexan, Cyclohexan und Tetrachlorkohlenstoff fest am Kieselgel adsorbiert wurden und somit im Startpunktbereich blieben. Entwickelt man dagegen das aufzutrennende Stoffgemisch mit Chloroform, Äther, Essigester oder n-Butanol, so stellt man fest, daß es wenig oder gar nicht adsorbiert wird und die einzelnen Inhaltstoffe dicht gedrängt nahe bzw. in der Lösungsmittelfront liegen.

Durch Mischen dieser beiden, sich bei der Chromatographie von Kawaextrakten extrem verhaltenden Lösungsmittelgruppen mußte sich daher ein System finden lassen, das zur Auftrennung führte.

Aus den Versuchsreihen, die hierzu aufgestellt wurden, erwiesen sich die folgenden Systeme als brauchbar:

1. Cyclohexan / Essigester (7/8 ; v/v);
2. Cyclohexan / Chloroform (1/1 ; v/v).

Zur Sichtbarmachung der einzelnen Substanzen verwendeten wir eine gesättigte Lösung von Antimontrichlorid in Chloroform und identifizierten die einzelnen Flecke durch Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen.

Einige Substanzen (Methysticin und Yangonin) wurden nach dem Besprühen der Platten schon im Tages-

licht sichtbar. Einen Überblick über die stattgefundene Trennung ermöglichte allerdings erst eine Betrachtung der Platten im UV-Licht.

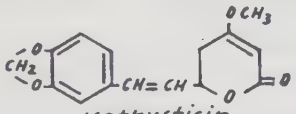
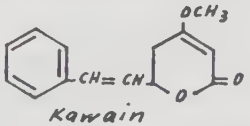
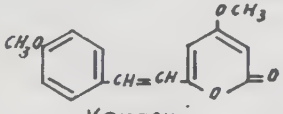
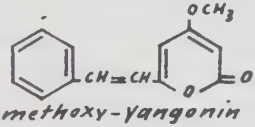
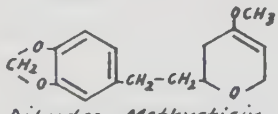
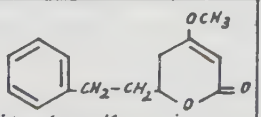
Durch Mitlaufenlassen von Reinsubstanzen stellten wir jedoch fest, daß Dihydrokawain und Dihydromethysticin weder vor der Purinlampe ($E_{max.}$ 260 mμ) oder im langwelligen UV-Licht ($E_{max.}$ 360 mμ) noch durch irgendeine Farbreaktion sichtbar wurden.

Da gerade diese beiden wichtigen Substanzen auf diese Weise nicht identifiziert werden konnten, mußten wir nach einer anderen Methode suchen, die ihre Lokalisierung ermöglicht.

Wir versuchten mit Hilfe der von STAHL beschriebenen Fluoreszenzplatten zum Ziele zu kommen. Hierbei wird dem Kieselgel G MERCK Natriumfluorescein zugesetzt. Die Substanzen erscheinen dann infolge Fluoreszenzlöschung im kurzwelligen UV-Licht als dunkle Flecke.

Durch Chromatographie des Extraktes auf diesen Fluoreszenz-Platten ergab sich nun eine Möglichkeit, alle bisher bekannten Kawastoffe durch Vergleich mit den authentischen Substanzen zu identifizieren: Hierbei wurden nur Dihydrokawain und Dihydromethysticin vor der Purinlampe ($E_{max.}$ 260 mμ), die anderen Kawalaktone jedoch nur vor der langwelligen UV-Lampe ($E_{max.}$ 360 mμ) sichtbar.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die R_f-Werte im Lösungsmittelsystem 1 auf Fluoreszenzplatten und die Färbungen der aufgetrennten Substanzen im Tages- und UV-Licht auf Silikagel-Platten nach dem Besprühen mit Antimontrichlorid in Chloroform.

	Substanz	Fluoreszenzlöschung 260mμ UV	Fluoreszenzlöschung 360mμ UV	Silikagel G Farbe im TL	Silikagel G Farbe im UV-L	R_f-Wert
1.	 Methysticin	-	+	w	org.	0,52
2.	 Kawain	-	+	gb.	do.	0,55
3.	 Yangonin	-	+	dg.	gbf.	0,64
4.	 Desmethoxy-yangonin	-	+	-	bf.	0,67
5.	 Dihydro-Methysticin	+	-	-	d.	0,57
6.	 Dihydro-Kawain	+	-	-	d.	0,58
7.	A B	+	+	rg.	dgb.	0,89

w = weinrot, og. = orangegelb, gb. = gelb, do. = dunkeloliv, dg. = dunkelgelb, gbf. = grünlichgelb fluoreszierend, bf. = blau-fluoreszierend, d. = dunkel, rg. = rötlichgelb, dgb. = dunkelgrünbraun.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung ergab also eine relativ gute Übersicht über die Bestandteile des Chloroformextraktes. Dabei ließen sich die bisher bekannten Kawa-Inhaltsstoffe - Methysticin, Kawain, Dihydrokawain, Dihydromethysticin, Yangonin und Desmethoxy-Yangonin - in einen R_f-Bereich von 0,5 - 0,7 zusammendrängen.

Ähnlich wie bei der Papierchromatographie des Kawaextraktes, zeigte sich auch hier im R_f-Bereich 0,9 ein dunkler Fleck, der verhältnismäßig weit außerhalb der Kawasubstanzen lag. Bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen mit dem Lösungsmittelsystem 2 (Cyclohexan / Chloroform 1 : 1 ; v/v) erfolgte jedoch eine deutliche Auftrennung dieses Fleckes.

Vermutlich handelt es sich hier um zwei neue, noch unbekannte Substanzen, die bisher durch das Fehlen einer analytischen Methode nicht aufgefunden worden waren.

Hauptaufgabe war es daher für uns, diese beiden Stoffe zu isolieren, zu charakterisieren und nach Möglichkeit ihre Konstitution zu ermitteln.

Der nächste Abschnitt behandelt die Isolierung der beiden Stoffe, wobei wir die beiden Substanzen zunächst als A (R_f = 0,83) und B (R_f = 0,9) bezeichnen.

3. Isolierung der beiden Substanzen A und B und von Desmethoxy-Yangonin.

Aus dem dünnschichtchromatographischen Verhalten wurde ersichtlich, daß A B zwei Substanzen sind, die sich durch gute Löslichkeit in lipophilen Lösungsmitteln auszeichnen. Wir versuchten daher, diese Stoffe mit einem Lösungsmittel, das in der eluotropen Reihe über dem Chloroform steht, aus dem Chloroformextrakt mehr oder weniger selektiv zu extrahieren.

a) Isolierung eines Mischkristallisates A B.

Zur Isolierung der noch unbekannten Kawa-Inhaltsstoffe wurde das gepulverte Rhizom mit Chloroform extrahiert und der Extrakt mit Äther versetzt, um die Hauptmengen von Yangonin und Methysticin aus dieser Lösung auszuscheiden. Das von diesen Stoffen befreite Filtrat wurde eingeengt, der Rückstand mit Seesand verrieben und mit Hexan perkoliert. Der ölige Rückstand, der nach dem Einengen des Perkolates zurückblieb, wurde in Benzol gelöst und die Lösung über Magnesiumsilikat WOELM chromatographiert und fraktionsweise aufgefangen.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung ergab, daß die ersten 20 Fraktionen zwar gleich zusammengesetzt, aber nicht einheitlich waren. Das Chromatogramm zeigte zwei Flecke bei R_f = 0,83 und R_f = 0,9. (Laufmittelsystem: Cyclohexan / Chloroform (1 : 1; v/v). Die Fraktionen wurden vereinigt und i.V. eingeengt. Den ölig gelben Rückstand lösten wir anschließend in siedendem Methanol und ließen in der Kälte auskristallisieren. Die erhaltenen rhombenför-

migen, gelben Kristalle schmolzen bei 108°C und betrugen 0,05 % des Ansatzes.

b) Isolierung von Desmethoxy-Yangonin.

Die folgenden Fraktionen No. 21 - 30 zeigten sich dünnschichtchromatographisch als einheitlich. Sie wurden vereinigt und nach dem oben beschriebenen Verfahren behandelt. Die so erhaltenen, schwach gelb gefärbten Nadeln vom Schmp. 139°C zeigten im Laufmittelsystem Cyclohexan / Essigester (7/8 ; v/v), einen R_f-Wert von 0,67, der identisch war mit dem vom authentischen Desmethoxy-Yangonin. Auch der Mischschmelzpunkt unserer Kristalle mit authentischem Desmethoxy-Yangonin+) zeigte keine Depression.

Die Ausbeute betrug 0,01 % der eingesetzten Drogenmenge.

c) Auftrennung des Stoffgemisches A B an Silikagel G MERCK.

Die Substanz vom Schmp. 108°C erwies sich, wie schon erwähnt, dünnschichtchromatographisch als nicht einheitlich. Es ergab sich daher für uns die Aufgabe, dieses Kristallgemisch in seine beiden Komponenten zu trennen.

Die dünnschichtchromatographischen Versuchsbedingungen gaben uns einen Hinweis für die Möglichkeit einer Trennung dieses Stoffgemisches. Es zeigte sich, daß das Silikagel G MERCK auch zur präparativen Säulenchromatographie und somit zur Trennung unseres

---

+) Herrn Prof.Dr.M.W.KLOHS, Kalifornien, möchte ich an dieser Stelle recht herzlich für die Zusendung einer Probe Desmethoxy-Yangonin danken.

Stoffgemisches gut verwendbar war. Wir konnten auf diese Weise 0,5 g des Mischkristallisates vom Schmp. 108°C in seine beiden Komponenten auftrennen. Die beiden scharf sich voneinander trennenden gelben Zonen wurden in Fraktionen von 10 ml gesammelt und fraktionsweise spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 360 mμ gemessen. Die graphische Auswertung dieser Meßergebnisse zeigt nachstehendes Kurvenbild.

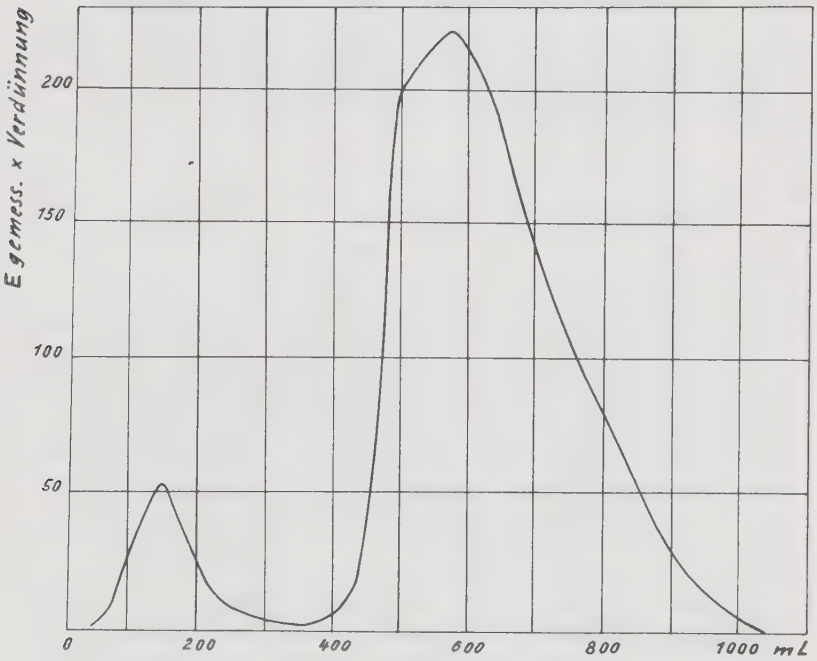


Abb. 2

Wie aus dem Kurvenbild ersichtlich ist, enthalten die Fraktionen 5 - 22 die Substanz B und die Fraktionen von 46 - 102 den Stoff A. Die Fraktionen von A wurden vereinigt, eingeengt und der Rückstand aus wenig Methanol umkristallisiert. Die erhaltenen Kristalle schmolzen bei 114 - 116°C und zeigten sich nunmehr dünnschichtchromatographisch im Laufmittelsystem Cyclohexan / Chloroform (1/1 ; v/v) als einheitlich zusammengesetzt. Der R_f-Wert lag bei 0,83. Die Ausbeute an A betrug 0,42 g.

Die Fraktionen von B ergaben unter den gleichen Bedingungen folgende Ergebnisse:
Die Substanz schmilzt bei 80 - 82°C und der R_f-Wert lag bei 0,9. Die Ausbeute betrug 0,04 g.

Der gelben Farbe wegen schlagen wir vor, die beiden Substanzen A und B als Flavokawin A (R_f = 0,83) und Flavokawin B (R_f = 0,9) zu bezeichnen.

Der folgende Abschnitt befaßt sich mit den Eigenschaften von Flavokawin A.

4. Charakterisierung von Flavokawin A.

Die derben, rhombenförmigen Kristalle haben einen Schmp. von 114 - 116°C. Sie sind gut löslich in Chloroform, Cyclohexan, n-Hexan und Benzol, schwerer in Methanol und Äthanol und sind nahezu unlöslich in Wasser.

Elementaranalyse+).

Die Bestimmung des Molekulargewichtes nach RAST und die Ergebnisse der Elementaranalyse (insgesamt 3 Bestimmungen) stimmten mit der Summenformel $C_{18}H_{18}O_5$ gut überein.

$C_{18}H_{18}O_5$ Mol.Gew. Ber.314,3
Gef.316,0

Ber.C = 68,78 ; H = 5,77 ; O = 25,45 ;
Gef.C = 68,68 ; H = 5,79 ; O++) 25,44 .

Die Farbreaktion mit konz. H_2SO_4 ergab eine tief orangerote Farbe.

Der positive Ausfall der $FeCl_3$-Reaktion - Farbumschlag der gelben Lösung nach braun mit einem roten Stich - veranlaßte uns zunächst die Anzahl der azetylierbaren Hydroxylgruppen festzustellen.

+) Analyt.Kontroll-Labor. der Fa.SCHERING A.G.Berlin,
++) Sauerstoff direkt bestimmt.

Die Analyse ergab aber, daß im Molekül nur eine azetylierbare Hydroxylgruppe enthalten ist:

$C_{20}H_{20}O_6$ (356,4)
Ber. C = 67,40 ; H = 5,66 ; $COCH_3$ = 12,1
Gef. C = 67,35 ; H = 5,80 ; $COCH_3$ = 10,7 (saure Verseifung).

Das Monoazetat hat einen Schmp. 109°C.

Die nach der Elementaranalyse ermittelten weiteren vier Sauerstoffatome mußten also auf andere Weise festgelegt sein. Die daraufhin durchgeführte Methoxylgruppenbestimmung ergab dann auch, daß drei der Sauerstoffatome als Methoxylgruppen im Flavokawin A enthalten sind.

$C_{18}H_{18}O_5$ (314,3) berechnet für 3 OCH_3
Ber. = 29,58 %
Gef. = 28,60 %

Somit waren zunächst einmal vier Sauerstoffatome im Molekül festgelegt; die noch fehlende fünfte Sauerstoffunktion ließ sich jedoch in diesem Stadium noch nicht ermitteln.

Aufschlußreich war jedoch, daß Flavokawin A eine aliphatische Doppelbindung im Molekül enthält, die sich mit Wasserstoff in Gegenwart eines Palladiumkatalysators nach PAAL[+)] leicht absättigen läßt. Die Dihydroverbindung hat einen Schmp. von 103°C.

$C_{18}H_{20}O_5$ (316,3)
Ber. C = 68,34 ; H = 6,37
Gef. C = 68,28 ; H = 6,63.

+) K.WIMMER, in Houben-Weyl, Methoden d.organ.Chem. Bd.IV,S.168,Stuttgart Thieme 1955

Flavokawin A zeigt also bei der Hydrierung ein ähnliches Verhalten wie die bekannten Kawalaktone, deren aliphatische Doppelbindungen sich unter den gleichen Bedingungen ebenfalls leicht hydrieren lassen[1)]

Es war daher zu überlegen, ob das Molekül von Flavokawin A nicht möglicherweise strukturelle Ähnlichkeit mit den Kawalaktonen aufweist.

Unsere Versuche zur Konstitutionsermittlung behandelt der folgende Abschnitt.

---

1) W.BORSCHE u.Mitarbeiter, Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 365 (1929)

5. Versuche zur Konstitutionsermittlung von Flavokawin A.

a) Das UV-Absorptionsspektrum von Flavokawin A zeigte bei einer Wellenlänge von 365 mμ ein Maximum, bei 264 mμ ein Minimum und hatte einen Kurvenverlauf, der an ein chromophores System erinnert, wie es bei den Chalkonen vorliegt.

Die Vermutung, daß es sich beim Flavokawin A seiner gelben Farbe wegen um ein Yangoninderivat, also um ein α-pyron handeln könnte, muß durch die eindeutige Festlegung von vier Sauerstoffunktionen als falsch angesehen werden. Aus diesem Grunde haben wir zunächst das Vorliegen einer chalkonähnlichen Struktur in Erwägung gezogen und für weitere Untersuchungen als Arbeitshypothese angenommen.

Eine einfache Möglichkeit, das Vorliegen einer Chalkonstruktur zu beweisen, ist die

b) Zyklisierung zum korrespondierenden Flavanon. Dies ist aber an die Bedingung geknüpft, daß sich in 2'-Stellung des Chalkons eine Hydroxylgruppe befindet. Wie oben bewiesen wurde, enthält Flavokawin A eine Hydroxylgruppe, deren Stellung bisher nicht festgelegt werden konnte. Es war daher zu untersuchen, ob sich ein solcher Ringschluß mit unserem Flavokawin A durchführen ließ.

Dieser gelingt nach FUJISE und SARAKI[1] durch Erhitzen einer schwach alkalisch-wässrigen Lösung des Chalkons. Da Flavokawin A in Wasser nahezu unlöslich ist, versuchten wir in Anlehnung an diese Methode

---

1) S.FUJISE u.L.SARAKI, Ber.dt.chem.Ges. 71, 34 (1938)

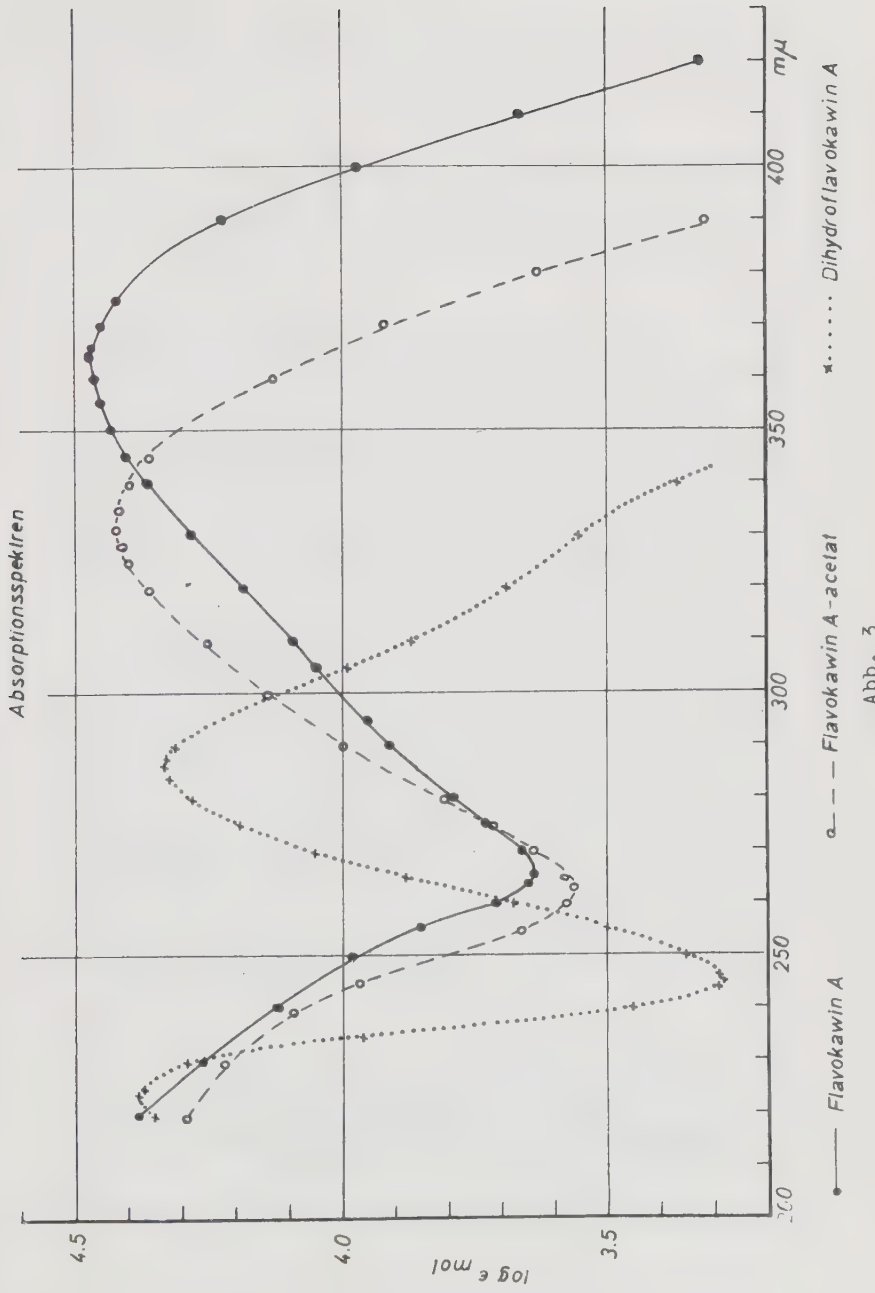

Absorptionsspektren
log ε mol
4.5
4.0
3.5
250
300
350
400
mμ
Flavokawin A
Flavokawin A-acetat
Dihydroflavokawin A

Abb. 3

in einer wässrig-methanolischen Lösung mit Natriumazetat zu zyklisieren.

Die papierchromatographische Untersuchung im System Eisessig / Wasser (15/85 ; v/v) zeigte vor der Purinlampe ($E_{max.}$ 260 mμ) infolge Fluoreszenzlöschung einen dunklen Fleck (R_f = 0,53). Nach dem Besprühen des Papierchromatogrammes mit methanolischer KOH wurde dieser Fleck nunmehr auch vor der Quarzlampe ($E_{max.}$ 360 mμ) und im Tageslicht gelbgefärbt sichtbar.

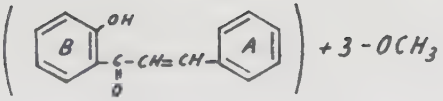
Bei der Reduktionsprobe auf Flavonoide mit metallischem Mg-Pulver nach SHINODA[1], zeigte die Reaktionslösung eine erdbeerrote Farbe. Auch die Reduktionsprobe mit Kaliumborhydrid[2] war positiv.

Somit war es uns gelungen, unsere Vermutung zu bestätigen, daß es sich beim Flavokawin A um ein Chalkon handelt. Auch die schon im vorigen Abschnitt nachgewiesene aliphatische Doppelbindung findet somit ihre Erklärung. Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen können wir also ein 2'-Hydroxychalkon mit 3 Methoxylgruppen als gesichert ansehen.

---

1) J.SHINODA, J.pharmac.Soc.Japan [Yakugakuzasshi] 48, 214 (1928)

2) R.M.HOROWITZ, J.org.Chem. 22, 1733 (1957)



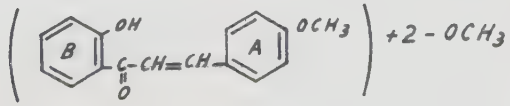
Im folgenden soll nun versucht werden, die Stellung der drei Methoxylgruppen zu ermitteln.

c) Alkalispaltung.

In Anlehnung an die Alkalispaltung der Flavonoide versuchten wir eine Alkalispaltung unseres Flavokawin A nach WAWZONEK[1] durchzuführen: Wir lösten unsere Substanz in 50 %iger methanolischer KOH, ließen den Alkohol auf dem siedenden Wasserbad verdunsten und erhitzten anschließend im Sandbad 3 Stunden lang bei 180°C am Rückflußkühler.

Durch diese Alkalispaltung konnten wir aus unserem Chalkon als Spaltprodukt nur p-methoxy-Benzoesäure (Anissäure) durch Vergleich mit authentischer Anissäure papierchromatographisch identifizieren.

Das zweite Spaltprodukt konnte noch nicht ermittelt werden. Somit können wir zunächst nur die Stellung einer Methoxylgruppe als gesichert ansehen. Diese muß sich also in Ring A in p-Stellung befinden.



---

1) St.WAWZONEK in R.C.Elderfield, Heterocyclic compounds, Vol. 2, S.383, New York 1951.

Um einen weiteren Hinweis auf die Konstitution - insbesondere der Methoxylgruppen - zu erhalten, diskutieren wir im folgenden das IR-Spektrum.

d) Infrarotspektroskopische Untersuchung von Flavokawin A.

Das IR-Spektrum von Flavokawin A läßt zunächst einmal zwei ausgeprägte, starke Banden bei 1634 und 1587 cm^{-1} erkennen. Beide Banden fallen in das Frequenzgebiet, in dem nach COLTHOP[1] vorwiegend Aromaten Absorptionsbanden aufweisen.

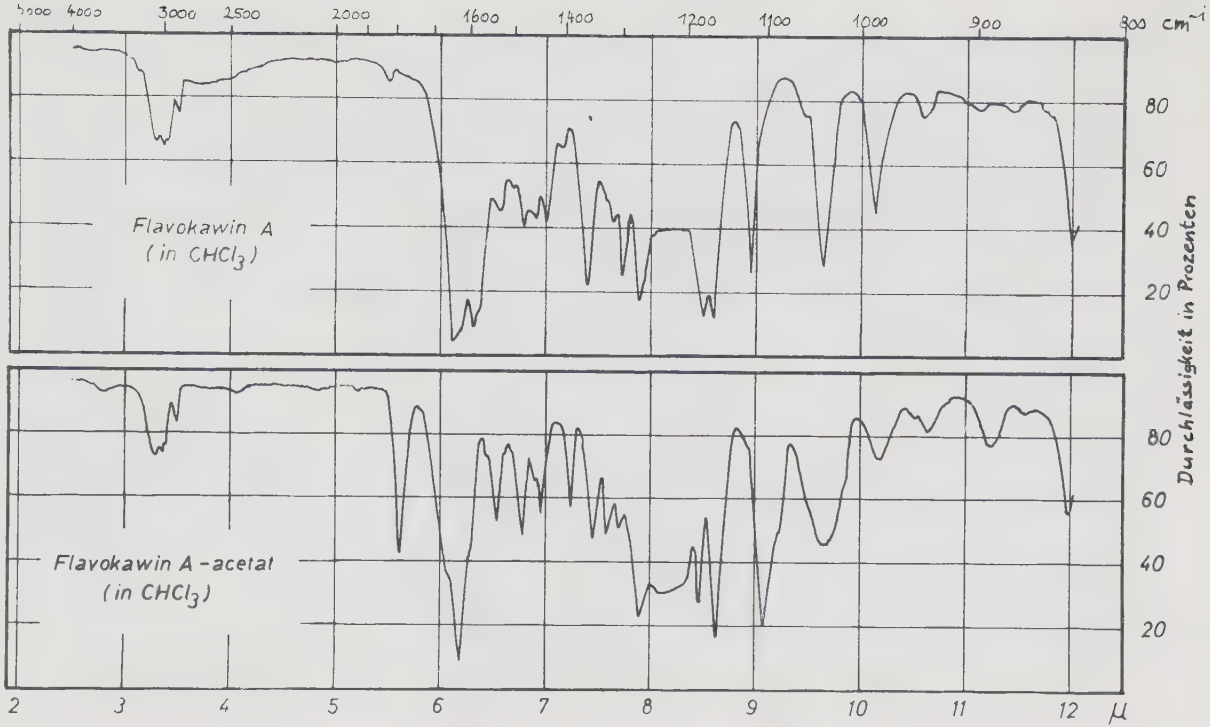
Charakteristisch für das Vorliegen einer aromatischen Struktur ist das Auftreten von drei Absorptionsbanden in den Bereichen 1600, 1560 - 1600 und 1500 cm^{-1} infolge Resonanzaufspaltung der C = C - Valenzschwingung der drei Doppelbindungen. Ihre Lagen sind innerhalb gewisser Grenzen konstant, ihre Intensitäten hängen jedoch weitgehend von der Art der Substituenten ab. Eine auffällige Verstärkung dieser Banden wird durch äußere Konjugation des Ringes mit einer Doppelbindung (wie C = O oder C = C) bewirkt, während sie in unkonjugierten Verbindungen nur schwach ausgeprägt sind.

Die Absorptionsintensität der beiden Banden in unserem Spektrum läßt das Vorliegen einer aromatischen Struktur mit einer Doppelbindung außerhalb des Ringes nicht ausschließen. Insbesondere die Verstärkung der Bande um 1587 cm^{-1} infolge äußerer Konjugation wird von RANDALL u.a.[2] als charakteristisch für eine derartige Konstitution gewertet.

---

1) COLTHOP, J.opt.Soc.America 40, 397 (1950)

2) RANDALL, FOWLER, FUSON u.DANGL, The Infra-red Determination of Organic Structures, New York (1949)



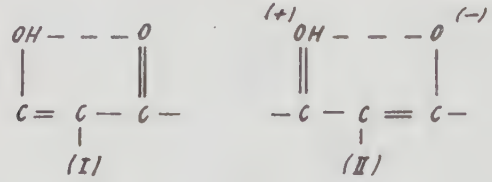
IR Spektren von Flavokawin A und Flavokawin A-acetat

Abb. 4

Auffallend allerdings ist die Lage der 1634cm^{-1} Bande, die für eine Aromatenbande zu weit verschoben ist. Hier läßt das Vorliegen einer Chalkonstruktur die Deutung zu, daß sich die Carbonylbande in diesen Absorptionsbereich verschoben hat.

Arylketone absorbieren in dem Bereich 1680 - 1700 cm^{-1}. Wenn sich jedoch eine aliphatische Doppelbindung in Konjugation zur Carbonylgruppe befindet, tritt ein Absinken der Frequenz nach 1665 - 1685 cm^{-1} ein. Benzalacetophenon, der Grundkörper der Chalkone, absorbiert bei 1667 cm^{-1}. Die weitere Frequenzverschiebung nach 1634 cm^{-1} in unserem Spektrum muß also noch eine andere Erklärung finden.

Befindet sich bei aromatischen Verbindungen in der 2-Stellung zur Carbonylgruppe eine Hydroxylgruppe, so kommt es zur Ausbildung eines Chelates. RASMUSSEN u.a.[1] beobachteten bei α, ß-ungesättigten-ß-Oxyketonen eine auffällig verstärkte und verbreiterte C = O - Absorptionsbande im Bereich 1538 - 1639 cm^{-1}, die sie einer Carbonylgruppe zuordneten, deren Doppelbindungscharakter durch Resonanz zwischen den Formen I und II verändert ist:



1) R.S.RASMUSSEN, D.TUNNICLIFF u.R.BRATTAIN, J.Amer.chem.Soc. 71, 1068 (1949)

Da bei aromatischen Verbindungen eine der Ringdoppelbindungen wie eine ungesättigte Gruppe in α, ß-Stellung wirken kann, liegt also bei einem 2'-Hydroxychalkon die von den Autoren untersuchte Struktur vor:

HERGERT und KURTH[1] gaben die Carbonylfrequenz von 2'-Hydroxychalkonen bei 1620 cm^{-1} an, jedoch werden weitere Substituenten - vor allem in 6'-Stellung - nicht ohne Einfluß auf eine geringfügige Verschiebung der Frequenz sein.

Bestätigt wird diese Zuordnung durch die Abwesenheit einer scharfen Bande im Bereich 3500 - 2500 cm^{-1}, die man einer Hydroxylgruppe zuordnen könnte. Nach RASMUSSEN[2] zeigt bei derartigen Verbindungen die OH-Gegend nur schwache Absorption bei 2700 cm^{-1}, die sich auch in unserem Spektrum erkennen läßt.

Die in dem oben erwähnten Bereich auftretende Bande bei 3030 cm^{-1} muß der aromatischen CH - Valenzschwingung zugeordnet werden. Ihr Auftreten zusammen mit den Banden bei 1587 und 1497 cm^{-1} ist charakteristisch für aromatische Verbindungen.

---

1) H.L.HERGERT u.E.F.KURTH, J.Amer.chem.Soc.75, 1622 (1953)

2) R.S.RASMUSSEN, D.TUNNICLIFF u.R.BRATTAIN, J.Amer.chem.Soc.71, 1068 (1949)

Weiterhin treten in den IR-Spektren aromatischer Verbindungen Banden im Bereich 650 - 1000 cm^{-1} auf. Ihr Auftreten rührt von der Deformationsschwingung von Wasserstoffatomen senkrecht zur Ringebene her und wird als Wagging-Schwingung bezeichnet. Ihre Lage wird bestimmt durch die Stellung der Substituenten, d.h. durch die Anzahl der am Ring verbleibenden benachbarten Wasserstoffatome. Die Banden in diesem Gebiet können also zur Erkennung des Substitutionstypus beitragen.

Auffallend ist die starke Bande in diesem Gebiet bei 833 cm^{-1}, die der 1.4-Substitution zugeordnet werden kann[1]. Das weitere Vorkommen von drei schwachen Banden bei 943, 899 und 873 cm^{-1} könnte einen Hinweis auf einen tetrasubstituierten Benzolring geben. So zeigt das IR-Spektrum von Trimethoxybenzoesäure in diesem Gebiet eine ähnliche Bandenlage.

Die Deutung einer Bande mittlerer Intensität bei 987 cm^{-1} läßt sich mit dem Vorliegen einer olefinischen Doppelbindung im Molekül erklären. RASMUSSEN und BRATTAIN[2] haben gezeigt, daß das Auftreten einer Bande in diesem Gebiet ein Beweis für das Vorliegen einer disubstituierten olefinischen Doppelbindung - und zwar in der trans-Form - ist. Die in unserem Spektrum vorliegende Verschiebung nach etwas höheren Frequenzen ist vielleicht durch die Konjugation mit der Carbonylgruppe erklärbar. Eine weitere Bande im Gebiet 1290 - 1310 cm^{-1} wird ebenfalls der CH-Valenzschwingung einer trans-Doppelbindung zugeordnet, ist jedoch in diesem Gebiet infolge der hier auftretenden

---

1) H.DANNENBERG, V.SCHIEDT u.W.STEIDLE, Z.Naturforsch. 86, 269 (1953)

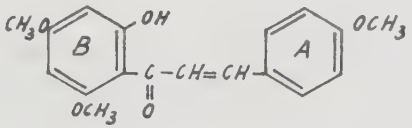
2) R.S.RASMUSSEN u.R.BRATTAIN, J.chem.Physics 15, 131, 175 (1947)

C-C-Valenzschwingung nicht so mit Sicherheit auszumachen.

Auffallend in unserem IR-Spektrum sind die starken Banden im Bereich 1000 - 1280 cm^{-1}. Die analytisch nachgewiesenen Methoxylgruppen geben Anlaß, daß einige dieser Banden von diesen Gruppen stammen könnten. Nach einer vergleichenden Untersuchung von BRIGGS und Mitarbeitern[1] kommt einer Bande bei 2857 cm^{-1} neben der bei 1471 cm^{-1} besondere diagnostische Bedeutung für das Vorliegen von Methoxylgruppen zu. Aryläther zeigen weiterhin eine starke Bande im Bereich 1230 - 1270 cm^{-1}, wobei nach COLTHUP bei den meta-Isomeren diese Banden bei etwas höheren Frequenzen auftreten als bei den anderen. Die Banden bei 1176, 1117 und 1036 cm^{-1} können nach der oben erwähnten Arbeit (BRIGGS) ebenfalls als Valenzschwingungen der C-O-Bindung gedeutet werden.

Abschließend kann gesagt werden, daß wir die Richtigkeit der chemischen Analyse durch die Diskussion des IR-Spektrums von Flavokawin A bestätigen konnten.

Eine eindeutige Aussage über die Stellung der Methoxylgruppen am Ring B des Chalkons kann jedoch nicht gemacht werden. Möglicherweise stehen die beiden Methoxylgruppen in meta-Stellung zueinander (1269 cm^{-1}), so daß für Flavokawin A die Konstitution eines 2'-Hydroxy-4.-4'-6'-trimethoxy-chalkons möglich wäre.



1) L.H.BRIGGS, L.D.COLEBROOK et al., Analytic.Chem. 29, 904-910 (1957)

Da wir auf chemischem Wege und auch durch das IR-Spektrum keine effektiven Aussagen über die Stellung der Methoxylgruppen am Ring B des Chalkons machen konnten, wollen wir fragen, welche Konstitution biogenetisch begünstigt wäre, wenn man die schon bekannten Kawa-Inhaltsstoffe den Überlegungen zu Grunde legt.

Zunächst jedoch soll über die bisher ermittelten Eigenschaften von Flavokawin B berichtet werden.

6. Bisher durchgeführte Untersuchungen zur Charakterisierung von Flavokawin B.

Flavokawin B unterscheidet sich in Farbe und Kristallstruktur wenig von Flavokawin A. Die derben, rhombenförmigen Kristalle zeigen auch gleiche Eigenschaften in bezug auf die Löslichkeit. Sie lösen sich leichter in lipophilen Lösungsmitteln wie Chloroform, Cyclohexan, n-Hexan und Benzol, weniger gut in Methanol und Äthanol und sind nahezu unlöslich in Wasser. Der Schmp. (80 - 82°) ist jedoch erheblich niedriger als der des Flavokawin A. Auch in den Tüpfelreaktionen mit konz. H_2SO_4 (tief orangegelbe Färbung) und mit methanolischer Eisenchloridlösung zeigen sich keine bemerkenswerten Unterschiede.

Es war also zu vermuten - nach der positiven Reaktion mit Eisenchlorid -, daß auch Flavokawin B eine phenolische OH-Gruppe enthält. Die Bildung des Monoacetates (Schmp. 133°C) bestätigte diese Annahme. Ferner trat beim Versetzen einer Flavokawin B-Lösung mit Zirkonoxychlorid sowie beim Alkalisieren der Lösung eine wesentliche Vertiefung der Gelbfärbung ein. Diese nahezu übereinstimmenden Eigenschaften - abgesehen vom Schmelzpunkt - von Flavokawin B mit Flavokawin A führten uns zwangsläufig zu der Annahme, daß es sich

1. auch beim Flavokawin B um ein Chalkon,
2. möglicherweise sogar um ein cis-Isomeres von Flavokawin A handeln könnte.

Die Ergebnisse der Elementaranalyse lassen unsere Annahme einer Chalkonstruktur für Flavokawin B

berechtigt erscheinen. Sie stimmen sehr gut auf die Summenformel $C_{17}H_{16}O_4$.

$C_{17}H_{16}O_4$ (284,3)
Ber. C = 71,82 ; H = 5,67 ; O = 22,51
Gef. C = 71,75 ; H = 5,90 ; O = 21,86

Eine cis-Konfiguration von Flavokawin A kann jedoch beim Flavokawin B auf Grund der Elementaranalyse nicht vorliegen.

Mit der Annahme des Vorliegens einer Chalkonstruktur bei Flavokawin B steht das UV-Spektrum der Verbindung in Übereinstimmung. Die Verbindung zeigt ein Maximum bei 340 mμ und ein Minimum bei 255 mμ.

Ein Vergleich der Summenformeln der beiden Substanzen läßt darauf schließen, daß möglicherweise Flavokawin B nur zwei Methoxylgruppen im Molekül enthält. Ein exakter Beweis für die Richtigkeit unserer Arbeitshypothese soll jedoch einer anderen Arbeit vorbehalten bleiben.

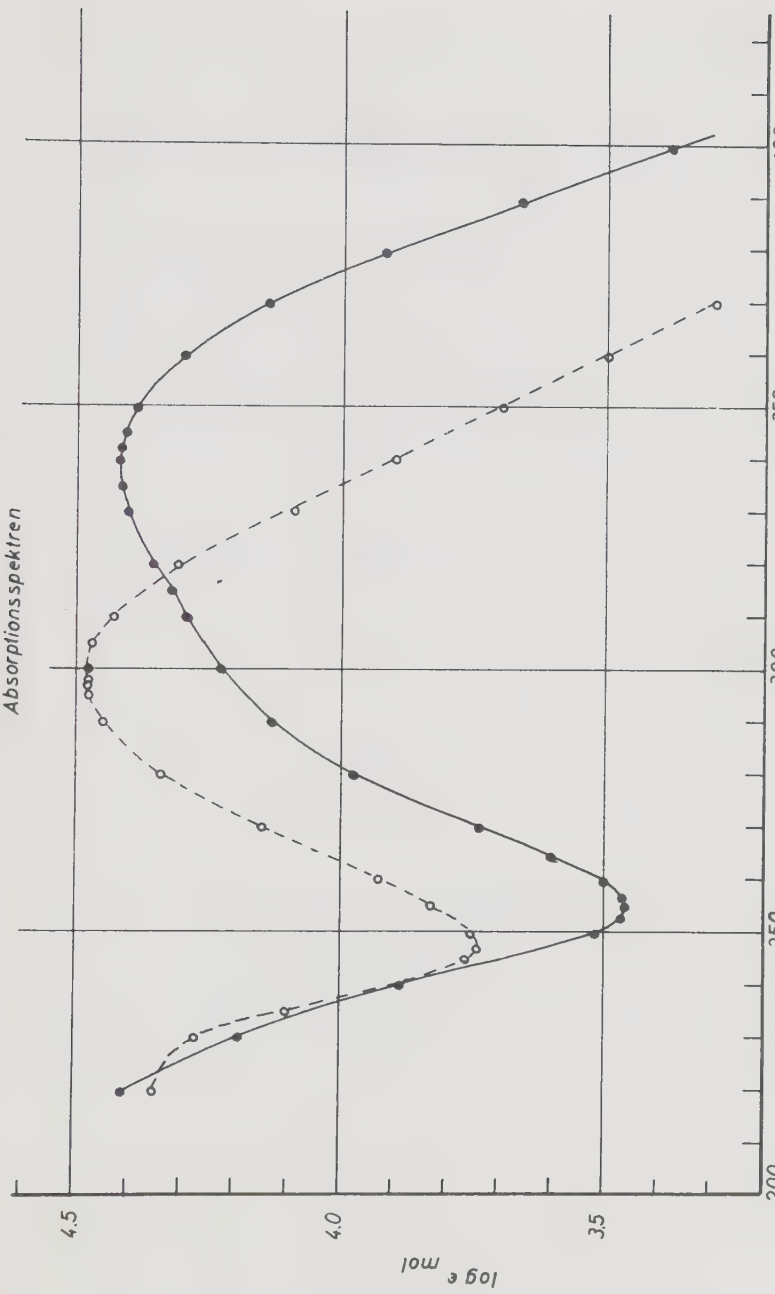

Absorptionsspektren
log ε mol
4.5
4.0
3.5
200
250
300
350
400
mμ
Flavokawin B
Flavokawin B-acetal

Abb. 5

a) Infrarotspektroskopische Untersuchung von Flavokawin B.

Auch das IR-Spektrum von Flavokawin B läßt - wie erwartet - weitgehende Ähnlichkeit mit dem des Flavokawin A erkennen.

Ein Vergleich der beiden Spektren zeigt, daß auch bei Flavokawin B die beiden stark ausgeprägten Banden bei 1631 und 1590 cm^{-1} auftreten. Das Spektrum weist die gleiche Carbonylfrequenzverschiebung und Verstärkung der Bande bei 1590 cm^{-1} auf wie bei Flavokawin A. Die Hydroxylgruppe in Flavokawin B muß sich also ebenfalls in 2'-Stellung befinden. Auch hier zeigt die OH-Gegend bei 2700 cm^{-1} eine schwache Absorption.

Auch im Bereich der Waggingschwingung tritt eine ähnliche Bandenlage auf (943, 893, 872 cm^{-1}), jedoch ist diese Bande bei 837 cm^{-1} wesentlich abgeschwächter. Ob sie wie bei Flavokawin A einer 1.4-Substitution zugeordnet werden kann, erscheint zweifelhaft.

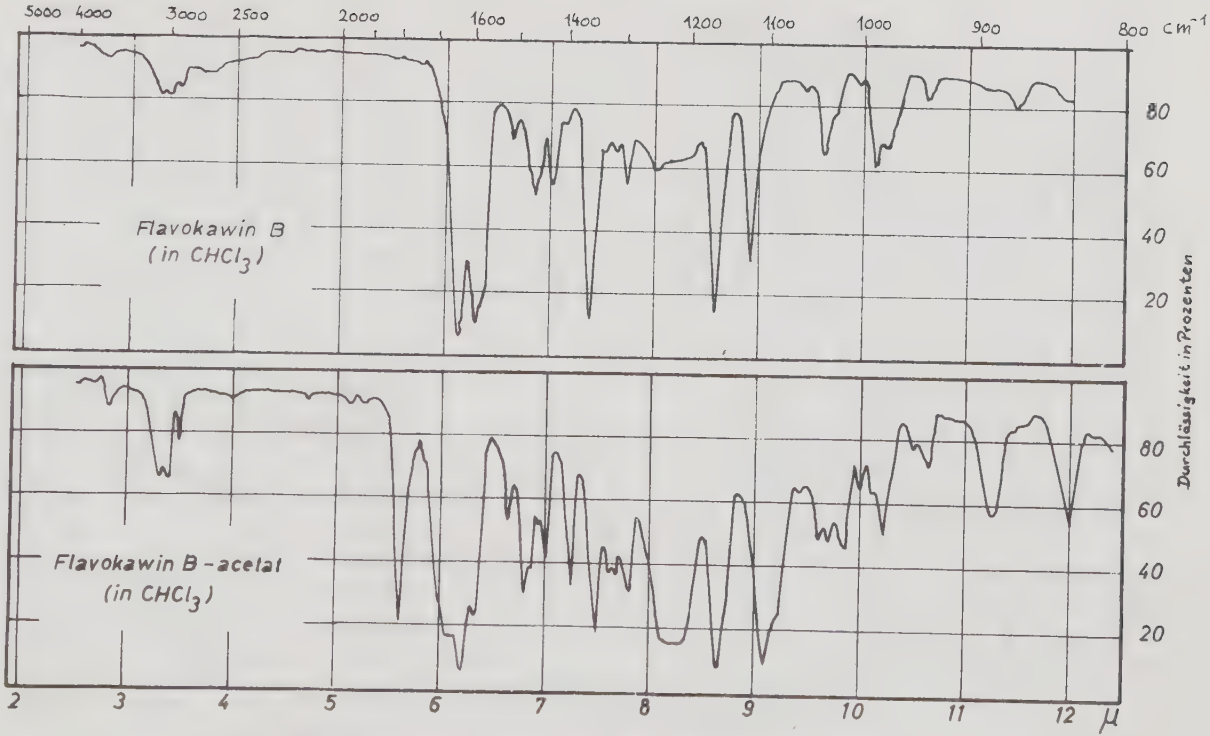
Die charakteristische Bande einer disubstituierten olefinischen Doppelbindung in trans-Form ist bei 990 cm^{-1} ebenfalls auszumachen, so daß wir auch die Bande bei 1292 cm^{-1} dieser Struktur zuordnen können.

Auffallend ist im Spektrum eine Bande bei 1351 cm^{-1}, die bei Flavokawin A nicht so stark ausgeprägt ist. Die Deutung dieser Bande stößt auf Schwierigkeiten, da sie sowohl einer C-O-Valenz als auch der OH-Deformationsschwingung zugeordnet werden kann.

Ebenso wie bei Flavokawin A treten im Spektrum

vom Flavokawin B die für das Vorliegen von Methoxylgruppen charakteristischen Banden bei 2857 und 1473 cm^{-1} auf, sie sind aber abgeschwächt. Auch die Bande bei 1250 cm^{-1} für Aryläther und bei 1117 und 1036cm^{-1} sind wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Bande bei 1176 cm^{-1} fehlt im Spektrum von Flavokawin B.

Nach dem Vergleich der beiden IR-Spektren läßt sich also abschließend sagen, daß es sich bei Flavokawin B ebenfalls um ein 2'-Hydroxychalkon handelt, das möglicherweise - und dafür sprechen auch die Ergebnisse der Elementaranalyse - eine Methoxylgruppe weniger enthält als Flavokawin A. Weitere Aussagen zur Konstitution von Flavokawin B konnten auch mit Hilfe des IR-Spektrums nicht ausgemacht werden.



IR-Spektren von Flavokawin B und Flavokawin B-acetat

Abb. 6

7. Zur Biogenese der C_6-C_3-C_6-Körper.

Die Strukturaufklärung organischer Naturstoffe wird gegenwärtig entscheidend unterstützt durch einen Nachweis ihrer Bildungsweise im pflanzlichen Organismus.

Dieses relativ junge Forschungsgebiet hat uns, insbesondere seit der Entdeckung der radioaktiven Isotope, einen Einblick in die biochemischen Vorgänge der Pflanzen und Tiere vermittelt. Erst durch die radioaktiven Isotope war es möglich geworden, ganz bestimmte physiologische Vorgänge exakt experimentell nachzuweisen. Es sei hier nur an die von CALVIN in allen Einzelheiten aufgeklärte Photosynthese erinnert.

Die Forschungsergebnisse sind in den letzten Jahren auf diesem Arbeitsgebiet soweit gediehen, daß man die Konstitution eines Naturstoffes erst dann als absolut gesichert ansieht, wenn eine solche Konstitution auch biogenetisch gesehen überhaupt möglich ist.

Andererseits kann die Kenntnis des Biosynthese-Weges dazu beitragen, die verschiedenen Möglichkeiten einer Konstitution aufzuzeigen.

Im Rahmen unserer vorliegenden Arbeit soll nun mit Hilfe der Kenntnis von der Biogenese der Flavonoide untersucht werden, welche Substitutionen von Hydroxyl- und Methoxylgruppen in den Molekülen unserer Flavokawine A und B im Vergleich mit den schon bekannten Kawa-Inhaltsstoffen möglich sind.

Die Biosynthese der Flavonoide läßt sich in der Endphase in zwei Stufen unterteilen:

1) in die Synthese eines C_6-C_3-Körpers
2) in die Kondensation zum C_6-C_3-C_6-Körper.

Die Bildungsweise des C_6-C_3-C_6-Körpers - eine Vorstufe zahlreicher, verschiedenartiger Naturstoffe - ist nach vorliegenden Untersuchungen auf zwei Wegen möglich:

entweder durch Kopf-Schwanz-Kondensation von Essigsäure-Einheiten, bei der entweder Phenole oder sog. Poly-ß-keto-säure-Zwischenprodukte entstehen[1],

oder über die Shikimi-Prephensäure, deren Biosynthese sich ihrerseits aus Produkten der Photosynthese erklären läßt[2].

Der weitere Syntheseweg führt dann möglicherweise über Phenylalanin oder Tyrosin zu den Zimtsäuren, die man heute als C_6-C_3-Vorstufen der Flavonoide ansieht[3].

---

1) A.J.BIRCH, in Fortschr.Chem.org.Naturst.14,186 (1957)

A.J.BIRCH, in A.R.TODD, Perspectives in Organic Chemistry (New York 1956, Intersc.Publishers Inc.), o.134

A.J.BIRCH u.H.SMITH, Chemical Society Special Publication (London), Nr. 12,1 (1958)

J.B.HENDRICKSON, in M.GATES, The Biogenesis of Natural Substances (New York 1960, Intersc. Publishers Inc.)

2) R.W.RICHARDS, in W.D.OLLIS (ed.): Chemistry of Natural Phenolic Compounds, p.1. Pergamon Press, Oxford-London-New-York-Paris. 1961

3) E.W.UNDERHILL, J.E.WATKIN and A.C.NEISH, Canad. J.Biochem.Physiol.35, 219, 229 (1957)

J.E.WATKIN and A.C.NEISH, Canad.J.Biochem.Physiol. 38, 559 (1960)

T.A.GEISSMAN and T.SWAIN, Chem.and Ind.1957,984

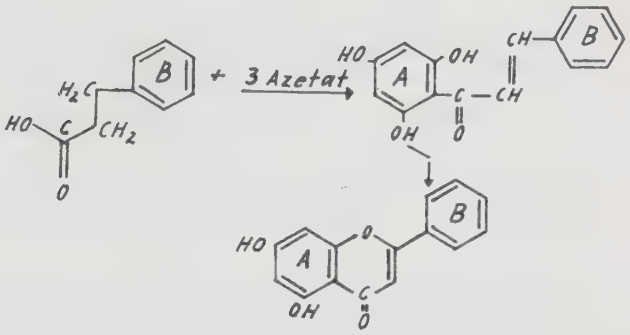
T.A.GEISSMAN and J.B.HARBORNE, Arch.Biochem.Biophysics 55, 447 (1955)

H.REZNIK and R.URBAN, Naturwissenschaften 44,13, 592 (1957)

E.C.BATE-SMITH, Chem.and Ind.1954, 1457; Sci. Proc.R.Dublin Soc.27,165 (1956)

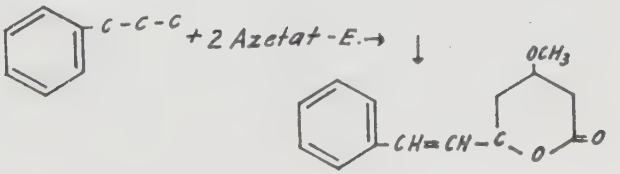
D.R.McCALLA and A.C.NEISH,Canad.J.Biochem.Physiol. 37,537 (1959)

Zur Bildung eines C_6-C_3-C_6-Körpers werden nunmehr - wie experimentell nachgewiesen - drei Azetateinheiten durch Kopf-Schwanz-Kondensation zu dem zweiten C_6-Körper vereinigt. Es wird also zunächst bei den Flavonoiden der Ring B und dann der Ring A gebildet, wobei als Zwischenprodukt der Flavonsynthese wahrscheinlich ein Chalkon auftritt.

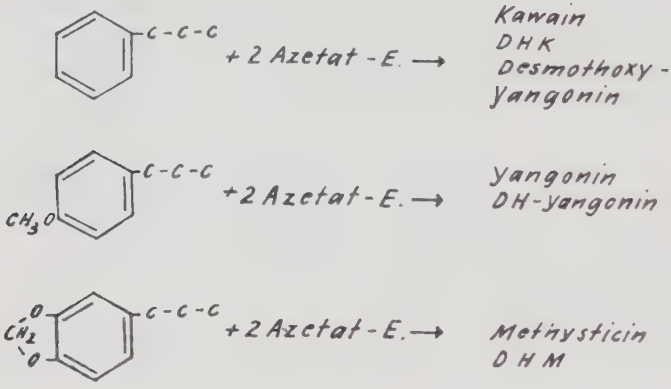


Biosynthese der Kawalaktone.

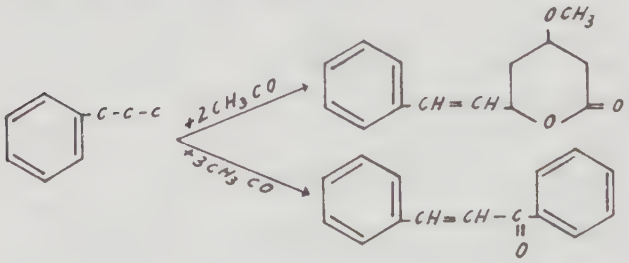
Die Bildung des Grundgerüstes der bisher isolierten Kawa-Inhaltsstoffe - der 6-styryl-α-pyrone - läßt sich biogenetisch dahin erklären, daß hier der Phenylpropankörper nur mit zwei Azetat-Einheiten kondensiert ist, wobei der Ring über ein O-Atom geschlossen wird:



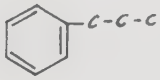
Je nach Art der Substitution des Zimtsäurederivates entstehen dann:

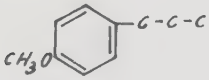


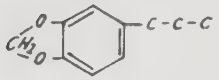
Das von uns isolierte Flavokawin A ist, wie wir chemisch bewiesen haben, ein Chalkon. Das Vorkommen von Chalkonen kann also als ein weiterer Schritt der biogenetischen Bildungsweise der Kawalaktone angesehen werden. Je nach der Kondensation mit zwei oder drei Azetateinheiten entstehen entweder Laktone oder Chalkone.



Wir kommen nun zu der eingangs aufgeworfenen Frage nach der möglichen Konstitution von Flavokawin A. Beide Stoffklassen - Laktone wie Chalkone - haben als Vorstufen C_6-C_3-Körper. Von den Kawa-Laktonen her sind uns hiervon drei Derivate bekannt:

1) 

2) 

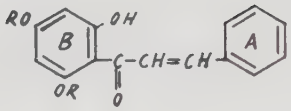
3) 

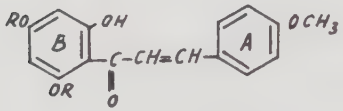
Es ist nun logischerweise nicht einzusehen, warum die Pflanze bei Stoffen, die biogenetisch so nahe verwandt sind, andere C_6-C_3-Körper für die Synthese der Chalkone bilden sollte. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Spaltprodukt unseres Flavokawin A, die Anissäure, die dem C_6-C_3-Körper des Yangonins entspricht.

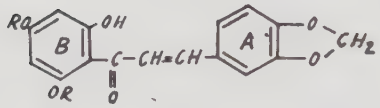
Bei Ring B ist die Phloroglucin-Konstitution infolge der Bildung aus drei Azetat-Einheiten weitaus die begünstigste. Die große Zahl der Flavonoide mit einer derartigen Konstitution bestätigt diese bevorzugte Bildungsweise. Erst in einem wesentlich geringerem Maße tritt der Oxyhydrochinontyp auf.

Wenn wir die von den Kawa-Laktonen her bekannten C_6-C_3-Körper ebenfalls als Vorstufe für die Chalkone betrachten, sind demnach folgende Konstitu-

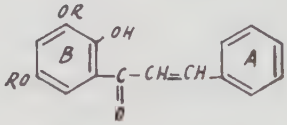
tionen begünstigt:

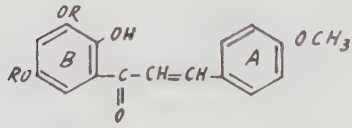
I 

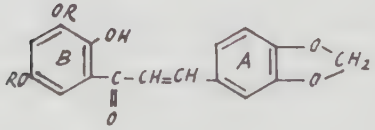
II 

III 

Erst in zweiter Linie sind dann die entsprechenden Chalkone mit einer Oxyhydrochinon-Konstitution im Ring B in Erwägung zu ziehen.

IV 

V 

VI 

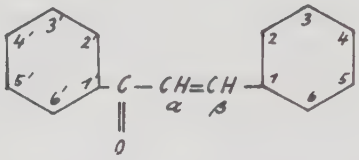
Nach der Molekulargewichts- und Methoxylgruppenbestimmung von Flavokawin A, sowie der als Spaltprodukt nachgewiesenen Anissäure besteht die Möglichkeit einer Konstitution entsprechend den Formeln II und V. Jedoch sind wir der Ansicht, daß für Flavokawin A vom biogenetischen Standpunkt aus gesehen die Konfiguration II, d.h. eines 2'-Hydroxy-4.4'.6'-trimethoxychalkons wesentlich wahrscheinlicher ist.

Da wir bei Flavokawin B nur über geringe analytische Ergebnisse verfügen, lassen sich zur Konstitution keine sicheren Aussagen machen. Nach der Summenformel $C_{17}H_{16}O_4$ enthält Flavokawin B eine Methoxylgruppe weniger im Molekül als Flavokawin A. Es wäre also denkbar, wenn man eine begünstigte Phloroglucin-Konstitution für den Ring A annimmt, daß die Methoxylgruppe in 4-Stellung des Ringes A fehlt. Flavokawin B hätte dann also den gleichen C_6-C_3-Körper wie Kawain und seine Derivate. Jedoch haben wir für diese Hypothese keinerlei Anhaltspunkte.

Zur möglichen Sicherung haben wir die in der Literatur beschriebenen Chalkone der Summenformel $C_{18}H_{18}O_5$, die in der Natur relativ selten vorkommen, dafür aber auf synthetischem Wege leicht zugänglich sind, in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Das unter No.8 aufgeführte, von KOSTANECKI synthetisierte Chalkon, scheint mit unserem Flavokawin A identisch zu sein.

Eine vergleichende Untersuchung des synthetischen Chalkons mit unserem Flavokawin A wird z.Z. in unserem Institut durchgeführt und bleibt einer späteren Veröffentlichung vorbehalten.

8) Übersicht über einige Chalkone mit drei Methoxyl-Gruppen und der Summenformel $C_{18}H_{18}O_5$



	Chalkon $C_{18}H_{18}O_5$	Schmp.	Aussehen u.Farbe	Literatur
1	2-Oxy-2'.4'.6'-trimethoxy-Chalkon	205,5	gelbe Prismen	N.M.CULLINANE, D.PHILPOTT, Soc. 1929, 1765, ref. BEILSTEIN 8, II, 547, Springer Verlag 1948
2	2'-Oxy-2.4'.6'-trimethoxy-Chalkon	106-108	gelbe Kristalle	G.BARGELLINI, E.PERATONER, G.49.II.67, ref. BEILSTEIN 8, I, 738, Springer Verlag 1931
3	2'-Oxy-4.4'.5'-trimethoxy-Chalkon	130	rote Nadeln	G.BARGELLINI, S.AURELI, R.A.L. 5 20 II, 123, ref. BEILSTEIN 8, I, 738, Springer Verlag 1931
4	4-Oxy-2',4',6'-trimethoxy-Chalkon	195-196	gelbe Kristalle	W.MOSIMANN, J.TAMBOR, B.49,1702 ref. BEILSTEIN 8, I, 739, Springer Verlag 1931
5	2'-Oxy-3.3'.4'-trimethoxy-Chalkon	127-128	gelbe Nadeln	St.v.KOSTANECKI, O.SCHLEIFENBAUM B.37,2631, ref. BEILSTEIN 8, 503, Springer Verlag 1925
6	2'-Oxy-4.3'.4'-trimethoxy-Chalkon	131-132	gelbe Tafeln	St.v.KOSTANECKI, B.SCHREIBER B.38,2749, ref. BEILSTEIN 8, 503 Springer Verlag 1925

	Chalkon $C_{18}H_{18}O_5$	Schmp.	Aussehen u. Farbe	Literatur
7	2-Oxy-4.6.4'-trimethoxy-Chalkon		orange-gelbe Blättchen	D.D.PRATT, R.ROBINSON, P.N.WILLIAMS Soc.125, 205 ref.BEILSTEIN 8, II, 546,Springer Verlag 1948
8	2'-Oxy-4-4'6'-trimethoxy-Chalkon	113	gelbe Nädelchen	St.v.KOSTANECKI, J.TAMBOR B.37,792 ref.BEILSTEIN 8, 503, Springer Verlag 1925
9	2'-Oxy-2.4.4'-trimethoxy-Chalkon	157	gelbe Nadeln	St.v.KOSTANECKI, V.LAMPE, S.TRIULZI,B.39, 92, ref.BEILSTEIN 8, 501, Springer Verlag 1925
10	2'-Oxy-2.4.5'-trimethoxy-Chalkon	118	orange-gelbe Nadeln	E.BONIFAZI, St.v.KOSTANECKI, J.TAMBOR,B.39,88 ref.BEILSTEIN 8, 501, Springer Verlag 1925
11	2'-Oxy-2.3'.4'-trimethoxy-Chalkon	105	hellgelbe Nadeln	S.S.COHEN, St.v.KOSTANECKI B.37, 2628, ref. BEILSTEIN 8, 502 Springer Verlag 1925
12	2-Oxy-2'.4'.5'-trimethoxy-Chalkon	159-160	grüne Nadeln	REIGRODSKI, J.TAMBOR,B.43, 1967, ref. BEILSTEIN 8,I,738 Springer Verlag 1931
13	2-Oxy-4- ß-oxyäthoxy -4'methoxy-Chalkon	134	gelbe wollige Nadeln	D.C.MOTWANI, T.S.WHEELER J.chem.Soc.London 1935, 1098-1101, ref.C.1935,II, 3232

	Chalkon $C_{18}H_{18}O_5$	Schmp.	Aussehen u. Farbe	Literatur
14	6-Oxy-4'.2.4-trimethoxy-Chalkon			F.WESSELY, K.STURM, Monatsh.Chem. 5354, 554-61 ref.C.1929,II, 3020
15	-Hydroxy-2'.4'.6'-trimethoxy-Chalkon	138-139	hellgelbe Nadeln	Act.chem.scand. 11,866-75,1957 ref.C.1958,8036
16	2'-Hydroxy- .4'.6'-trimethoxy-Chalkon	113	gelbe Nadeln	Y.KIMURA u. M.HOSHI, Proc.Imp. Acad.(Tokio)12 1936 285, ref. C.1958, 8036
17	2'-Hydroxy-4'.2.3-trimethoxy-Chalkon	130-131	gelbe Nadeln	Ann.Chimica 47, 75-86.Jan.1957, Roma, ref.C.1958, 10936
18	2'-Hydroxy-5'.2.3-trimethoxy-Chalkon	101-102	orange Nadeln	Ann.Chimica 47, 75-86, Jan.1957, Roma, ref.C.1958 10936
19	2'Oxy-3.4.4'-trimethoxy-Chalkon	131-132	gelbe Nadeln	A.SCHIAVELLO u. C.SEBASTIANI Gazz.Chim.ital.79 909-13,Dez.1949, ref.C.1950,II,1684
20	2-Oxy-4.3'.4'-trimethoxy-Chalkon	156-158	gelbe Nadeln	A.SCHIAVELLO u. C.SEBASTIANI Gazz.Chim.ital.79 909-13,Dez.1949, ref.C.1955; 1683
21	2-Oxy-4.6.2'-trimethoxy-Chalkon	113-114	leuchtend gelbe Platten	N.NARASIMHACHARI, D.RAJAGOPALAN u. T.R.SESHADRI Proc.Indian.Acad. Sci.Sect.A.36, 231-43,Okt.1952 ref.C.1955,9795

	Chalkon $C_{18}H_{18}O_5$	Schmp.	Aussehen u. Farbe	Literatur
22	2-Oxy-3.4.2'-trimethoxy-Chalkon	103-104	leuchtend gelbe Prismen	N.NARASIMHACHARI D.RAJAGOPALAN u. T.R.SESHADRI Proc.Indian. Acad.Sci.Sect.A. 36,231-43,Okt. 1952, ref. C.1955, 9795
23	2'-Oxy-3.4.6'-trimethoxy-Chalkon	125	gelbe Nadeln	T.A.GEISSMAN, L.JURD, J.Amer.Chem.Soc. 76, 4475-76, 5/9.1954,ref. C.1955, 6291
24	3'-Oxy-3.4.5-trimethoxy-Chalkon	173-174	gelbe Kristalle	R.G.CHRISTIANSEN, RAYMOND,B.BROWN, A.S.HAY,A.NICKON u.R.B.SANDIN, J.Amer.Soc.77, 948-51,20/2.1955, ref.C.1955,5533
25	2'-Oxy-3.3'.4'-trimethoxy-Chalkon	127	orangerote Rhomben	H.RICHTZENHAIN u. B.ALFREDSSON Acta.chem.scand.7 1953 1177 u. 8 1954 1519, ref. C.1957, 668
26	2'-Oxy-4.3'.5'-trimethoxy-Chalkon	121,5-122,5	gelbe Nadeln	Chem.and Ind.1955 1672,17/12, ref. C.1957, 3263

9. Pharmakologische Untersuchung.

Die pharmakologische Untersuchung des Substanzgemisches A B (Schmp. 108°C) wurde am Pharmakologischen Institut der Universität Freiburg, Leiter Prof. Dr. F. HAHN+), durchgeführt.

Die Substanz wurde 2 %ig in Ol.Arachidis suspendiert und männlichen Mäusen mit einem Gewicht von 16 - 24 g i.p. verabreicht. Die Beobachtungszeit betrug 24 Stunden. Während dieser Zeit zeigten die verwendeten Mäuse selbst bei Dosen von 1200 mg/kg Versuchstier keinerlei Veränderungen in ihrem Verhalten: keine Anzeichen für Sedation, normale Mobilität und Futteraufnahme.

+) Herrn Prof.Dr.F.HAHN, Freiburg, möchte ich an dieser Stelle recht herzlich für die pharmakologische Prüfung der Substanzen danken.

C. Z U S A M M E N F A S S U N G .

1.) Die bisher bekannten Kawalaktone wurden als Vergleichssubstanzen für analytische Untersuchungen neu isoliert.

2.) Es konnte eine dünnschichtchromatographische Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, eine Übersicht über die Inhaltsstoffe eines Kawaextraktes zu gewinnen.

3.) Aus dem Rhizom von Piper methysticum FORST. wurden zwei neue gelbe Farbstoffe isoliert, die als Flavokawin A ($C_{18}H_{18}O_5$, Schmp. 114 - 116°C) und Flavokawin B ($C_{17}H_{16}O_4$, Schmp. 80 - 82°C) bezeichnet wurden. Versuche zur Konstitutionsermittlung ergaben, daß es sich bei Flavokawin A um ein Chalkon handelt. Die Möglichkeit der Struktur eines 2'-Hydroxy-4.4'.6'-trimethoxy-Chalkons wird diskutiert. Die beiden isolierten Inhaltsstoffe sind pharmakologisch inert und dürften daher an der Drogengesamtwirkung nicht beteiligt sein.

D. E X P E R I M E N T E L L E R T E I L .

Isolierung der bekannten Kawa-Inhaltsstoffe mit Hilfe von Aluminiumoxyd.

1 kg Kawarhizompulver wurde erschöpfend mit Äther im Soxhlet extrahiert. Während dieser Zeit schieden sich auf dem Boden des Extraktionsgefäßes gelbbraune Kristallklumpen ab (K). Der überstehende Ätherextrakt (ca. 800 ml) wurde filtriert und auf 400 ml eingeengt = Ätherextrakt A.

a) Aufarbeitung des Kristallgemisches (K).

Das gelbbraune Kristallgemisch besteht hauptsächlich aus Yangonin und Methysticin, die durch fraktionierte Kristallisation rein gewonnen werden können.

20 g des Mischkristallisates (K) wurden in 400 ml Methanol heiß gelöst und nach 24 Stunden die ausgeschiedenen Yangoninkristalle abgetrennt und durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Essigester rein erhalten.

Ausbeute : 10 g Yangonin, opalisierende, säulenförmige gelbe Kristalle, Schmp. 154°.

Zur Gewinnung des Methysticins wurde die Mutterlauge der Yangoninfraktion auf 100 ml eingeengt und zur Kristallisation in den Eisschrank gestellt. Die ausgefallenen Kristalle wurden durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol gereinigt.

Ausbeute : 6 g Methysticin, weiße seidenglänzende Nadeln. Schmp. 137°C.

b) Säulenchromatographische Auftrennung des Ätherextraktes A.

Der Ätherextrakt A wurde an neutralem Aluminiumoxyd MERCK (Aktivitätsstufe II - III) chromatographiert. (Maße der Säule : 30 cm x 3,5 cm). Sechs verschiedene Zonen konnten beobachtet werden:

1. Zone	ca.	1 cm breit	orange
2. Zone	ca.	4 cm breit	rotbraun
3. Zone	ca.	10 cm breit	gelb
4. Zone	ca.	8 cm breit	hellgrün
5. Zone	ca.	5 cm breit	gelbbraun
6. Zone	ca.	1 cm breit	gelbbraun

Beim Eluieren mit Äther blieben die Zonen 1 - 4 fest am Aluminiumoxyd haften. Nur die 5. und 6. Zone ließen sich eluieren, wozu ca. 400 ml Äther benötigt wurden. Wegen teilweiser Überlappung konnten diese beiden Zonen jedoch nicht fraktioniert werden.

Isolierung von Kawain.

Das Eluat der Zone 5 und 6 wurde auf die Hälfte eingeengt und für 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgetrennt, die Mutterlauge (I) auf 100 ml eingeengt und erneut in den Eisschrank gestellt. Auf diese Weise konnte eine weitere Menge Kristallisat aus der Lösung gewonnen werden.
Ausbeute : 6 g Rohkawain.

Das erhaltene Rohkawain wurde aus einem Butanol-Petroläthergemisch umkristallisiert. 6 g Rohkawain wurden in 20 ml Butanol heiß gelöst und mit 20 ml Petroläther versetzt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden mit reinem Petroläther gewaschen und

im Exsikkator getrocknet.
Ausbeute : 4 g Kawain, seidenglänzende, weiße Nadeln. Schmp. 107 - 108°C.

c) Isolierung von Dihydrokawain.

Die Gewinnung des Dihydrokawain erfolgte aus der grüngefärbten Mutterlauge (I) des Kawains. Diese wurde dreimal jeweils 20 Min. mit Aktiv-Kohle MERCK geschüttelt bis schließlich die Lösung nur noch schwach gelb gefärbt war. Dann wurde auf etwa 30 ml eingeengt und in den Eisschrank gestellt. Nach 24 Stunden waren kleine Prismen ausgefallen, die nochmals aus Äther umkristallisiert wurden.
Ausbeute : 2 g Dihydrokawain, weiße Prismen. Schmp. 58 - 60°C.

d) Isolierung von Dihydromethysticin.

Die Isolierung des Dihydromethysticins erfolgte aus der 3. Zone der Aluminiumoxydsäule. Wie schon im Hauptteil beschrieben, bleibt Dihydromethysticin fest am Aluminiumoxyd haften. Ein Eluieren aus der Säule war also in diesem Fall nicht möglich. Dihydromethysticin gibt aber mit konz. H_2SO_4 eine karmesinrote Farbe. Die Dihydromethysticin enthaltende Zone ließ sich daher - nach Ausstoßen der Säule - durch diese Farbreaktion leicht erkennen. Sie wurde von den übrigen Zonen der Säule getrennt und im Soxhlet mit Methanol extrahiert. Der erhaltene gelbgefärbte Extrakt wurde i.V. eingeengt und der gelbe, ölige Rückstand mit 100 ml Äther versetzt. Die Lösung wurde für 24 Stunden in den Eisschrank gestellt. Nach dieser Zeit hatte sich ein dicker Kristallbrei gebildet, der abgesaugt und mit 50 ml eisgekühltem

Äther gewaschen wurde.

Die Kristalle wurden in 80 ml Methanol gelöst. Nach einigen Stunden fielen zunächst wenig gelbe Kristalle (0,8 g) vom Schmp. 154°C aus = Yangonin. Nach weiterem Einengen der Lösung auf ca. 60 ml wurden weiße Kristalle (0,5 g) erhalten, die als Methysticin identifiziert wurden. Bei weiterem Einengen der Mutterlauge auf ca. 40 ml kristallisierten nach mehreren Stunden schließlich derbe Prismen aus, die abgesaugt und mehrmals aus Methanol umkristallisiert wurden = Dihydromethysticin.

Ausbeute : 3 g Dihydromethysticin, weiße, derbe Prismen. Schmp. 118°C.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen.

Für die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen nach STAHL wurde die DESAGA-Apparatur+) verwendet. Es wurde in luftdicht schließenden Glaskammern nach der aufsteigenden Methode chromatographiert. Als Träger der Adsorptionsschichten dienten quadratische Platten aus Glas von 20 cm Kantenlänge.

30 g Kieselgel G MERCK für die Dünnschichtchromatographie wurden mit 60 ml destilliertem Wasser gleichmäßig verrieben und innerhalb von 3 Min. auf fünf vorbereitete Glasplatten aufgestrichen. Anschließend wurden die Platten 30 Min. im Trockenschrank bei 110°C getrocknet und bis zur Verwendung im Exsikkator aufbewahrt. Zur Herstellung der Fluoreszenzplatten wurde an Stelle des Wassers 60 ml einer 0,04 %igen wässerigen Lösung von Na.-Fluoreszein MERCK verwendet.

Untersucht wurden 0,1 %ige Kawaextraktlösungen in Chloroform, von denen jeweils 10 µl mit Pipetten auf die Platten aufgetragen wurden. Die Laufstrecke betrug 10 cm.

Als Laufmittel wurden folgende Lösungsmittelsysteme verwendet :

1.) Essigester / Cyclohexan (7 / 8 ; v/v)
2.) Chloroform / Cyclohexan (1 / 1 ; v/v)

+) Fa.DESAGA, Heidelberg

Im Laufmittelsystem 1 konnten folgende R_f-Werte ermittelt werden:

Methysticin	R_f = 0,52
Kawain	R_f = 0,55
Yangonin	R_f = 0,64
Desmethoxy-Yangonin	R_f = 0,67
Dihydrokawain	R_f = 0,58
Dihydromethysticin	R_f = 0,57

Für die Auftrennung des Stoffgemisches Flavokawin A und Flavokawin B (Schmp. 108°C) wurde das Laufmittelsystem 2 verwendet. Die R_f-Werte lagen dann für

Flavokawin A	R_f = 0,83
Flavokawin B	R_f = 0,90

Nach erfolgter Entwicklung wurden die Platten mit einer gesättigten Antimontrichlorid-Lösung in Chloroform besprüht und vor der Analysenquarzlampe ($E_{max.}$ 360 mμ) betrachtet.

Dihydrokawain und Dihydromethysticin geben sich nur auf Fluoreszeinschichtplatten vor der Purinlampe ($E_{max.}$ 260 mμ) durch Fluoreszenzlöschung als dunkle Flecke zu erkennen.

Die Identifizierung der Flecke wurde durch gleichzeitiges Mitlaufenlassen von Vergleichssubstanzen ermittelt.

Isolierung von Flavokawin A und B.

1. Extraktion des Pflanzenmaterials.

1000 g Kawawurzelpulver wurden mit 2 Litern Chloroform im Soxhlet 48 Stunden extrahiert und der Chloroformextrakt mit 1 Liter Äther versetzt. Nach zwei Tagen hatten sich aus der Lösung gelbbraune Kristallklumpen abgeschieden, die hauptsächlich aus Yangonin und Methysticin bestanden und durch Filtration abgetrennt wurde. Das klare Filtrat wurde i.V. vom Lösungsmittel befreit.
Ausbeute : 60 g.

2. Isolierung eines aus Flavokawin A und B bestehenden Mischkristallisates mit Hilfe der präparativen Säulenchromatographie.

60 g dieses Extraktes wurden mit 1700 g gereinigtem Seesand gut verrieben und in eine Chromatographieröhre (5,5 cm Ø x 60 cm Länge) gegeben. Darauf wurde mit 4 Litern Hexan (Kp. 68,7°) perkoliert. Die ersten 200 ml des bräunlich gefärbten Perkolates wurden verworfen und die folgende gelb gefärbte Lösung getrennt aufgefangen.
Tropfgeschwindigkeit : 80 Tr. / pr.Min. .
Die Fraktion wurde i.V. eingeengt und der braungelbe ölige Rückstand (20 g) in 40 ml Benzol aufgenommen. Die filtrierte Lösung wurde auf eine Säule (5 cm Ø x 50 cm Länge) gebracht, die mit 100 g fest zusammengedrücktem Magnesiumsilikat WOELM beschickt war. Die Korngröße dieses Handelsproduktes stellten wir auf 0,01 - 0,1 mm ein Eluiert wurde mit insgesamt 1500 ml Benzol in 30 Fraktionen zu je 50 ml. Die Fraktionen No. 1 - 20 erwiesen sich nach der dünnschichtchroma-

tographischen Untersuchung als gleich zusammengesetzt. Sie wurden daher vereinigt und das Lösungsmittel i.V. abdestilliert. Der Rückstand wurde in siedendem Methanol gelöst und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt, mit kaltem Methanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet.
Gelbe Kristalle. Schmp. 108°C, Ausbeute 0,5 g.

3. Trennung von Flavokawin A und B.

In eine Chromatographiesäule (5 cm Ø x 50 cm Länge) wurde eine Suspension von 190 g Kieselgel G MERCK in Cyclohexan / Chloroform (1 / 1 ; v/v) gegeben. Nach Absetzen des Kieselgels betrug die Höhe der Säule 23 cm. Die Kristalle (0,5 g ; Schmp.108°C) wurden in 20 ml des obigen Lösungsmittelgemisches gelöst und auf die mit Lösungsmittel bedeckte Säule gebracht. Dann wurde mit Cyclohexan / Chloroform (1 / 1 ; v/v) eluiert.

Bei der Chromatographie bildeten sich zwei gelbe Zonen aus, die durch eine farblose Zone getrennt waren. Diese wurden fraktioniert aufgefangen und i.V. vom Lösungsmittel befreit. Die beiden Rückstände wurden aus Methanol umkristallisiert.
Fraktion 1 gelbe Kristalle, Schmp. 80 - 82°C
Fraktion 2 gelbe Kristalle, Schmp.114 -116°C
Ausbeute: Schmp. 80 - 82°C = 0,05 g
Ausbeute: Schmp.114 -116°C = 0,42 g

Eigenschaften von Flavokawin A Schmp. 114°C.

1.) Löslichkeit:
Flavokawin A ist leicht löslich in Chloroform, Cyclohexan, n-Hexan und Benzol, schwerer in Methanol und Äther, praktisch unlöslich in Wasser.

2.) Farbreaktionen:
a) konz. H_2SO_4:
Flavokawin A löst sich in konz. H_2SO_4 mit tief orangeroter Farbe.
b) Eisenchloridreaktion:
3 ml einer 0,1 %igen methanolischen Flavokawin-A-Lösung färbten sich nach Zugabe von 1 Tropfen einer 1 %igen methanolischen Ferrichlorid-Lösung braun mit einem roten Stich.
c) Zirkonoxychloridreaktion:
Methanolische $ZrOCl_2$-Lösung gibt eine starke Vertiefung des gelben Farbtones einer Flavokawin-A-Lösung.

3.) Elementaranalyse+):
Zur Analyse wurde die Substanz 24 Stunden bei 64°C im Vacuum über P_2O_5 getrocknet.
$C_{18}H_{18}O_5$ (314,3).

$C_{18}H_{18}O_5$ (314,3) Ber. C = 68,67 ; H = 5,77 ; O = 25,45
Gef. C = 68,46 ; H = 6,16 ; O+) = 25,44
C = 68,32 ; H = 6,05 ;
C = 69,10 ; H = 5,18 ;
Ber. OCH_3 = 29,58
Gef. OCH_3 = 28,60

+) Analyt. Kontroll-Labor. der Fa.SCHERING A.G.,Berlin

Molekulargewicht nach RAST Gef. = 316.

4.) IR-Absorptionsspektrum von Flavokawin A.

Das Spektrum von Flavokawin A wurde mit einem vollautomatischen BECKMANN-IR-Spektrophotometer im Frequenzbereich von 4000 - 850 cm^{-1} in Chloroform aufgenommen.

Tabelle 1

Bandenfrequenz $[cm^{-1}]$

s	m	w
		3030
		2967
		2857
		1818
1634		
1613		
1587		
	1524	
	1497	
	1471	
	1449	
	1429	
		1403
1353		
	1312	
1295		
1269		
1176		
1163		
1117		
		1058
1036		
	987	
		943
		873
		833

s = starke
m = mittelstarke
w = schwache Banden

5.) Azetylierung.

94 mg Flavokawin A (Schmp. 114°) wurden in wenig Pyridin gelöst und zu der intensiv gelb gefärbten Lösung 6 ml Essigsäureanhydrid gegeben. Nach 48 Stunden wurde die blasse gelb gewordene Flüssigkeit mit 12 ml Wasser versetzt und für 2 Stunden in den Kühlschrank gestellt. Nach dieser Zeit hatten sich schwach gelb gefärbte Kristalle ausgeschieden, die abgesaugt und mit Äthanol gewaschen wurden. Es wurde aus heißem Äthanol umkristallisiert. Ausbeute : 0,052 g ; Schmp. 109°C.

a) Elementaranalyse der Azetylverbindung+).

Zur Analyse wurde die Substanz 24 Stunden bei 64°C im Vacuum über P_2O_5 getrocknet.

$C_{20}H_{20}O_6$ (356,4)

Ber. C = 67,40 ; H = 5,66 ; $COCH_3$ = 12,1
Gef. C = 67,35 ; H = 5,80 ; $COCH_3$ = 10,7
(saure Verseifung)

+) Analyt. Kontroll-Labor. der Fa.SCHERING A.G.,Berlin

6.) IR-Absorptionsspektrum von Flavokawin A-azetat.

Das Spektrum von Flavokawin A-azetat wurde mit einem vollautomatischen BECKMANN IR-5-Spektrophotometer im Frequenzbereich von 4000 - 850 cm^{-1} in Chloroform aufgenommen.

Tabelle 2

Bandenfrequenz $[cm^{-1}]$

s	m	w
		3030
		2857
	1765	
1613		
	1524	
	1475	
	1433	
	1379	
	1337	
	1312	
	1299	
1264		
1239		
1178		
1159		
1101		
	1037	
		983
		939
		892
	833	

s = starke
m = mittelstarke
w = schwache Banden

7.) Hydrierung.

28,97 mg Flavokawin A (Schmp. 114°C) wurden mit 5 ml eines vorhydrierten Katalysators (Palladiumlösg. kolloidal n.PAAL[+]) bei einer Temperatur von 20°C und 766 Torr in 50 ml Methanol hydriert. Innerhalb einer halben Minute wurden 1,97 mol Wasserstoff aufgenommen (berechn. für 1 Mol H_2 = 2,04 ml).
Eine weitere H-Aufnahme fand nicht statt.
Aus dem Reaktionsgemisch wurde mit Äther der Katalysator ausgefällt und die filtrierte Lösung im Vacuum eingeengt. Weiße Nadeln, die aus Methanol umkristallisiert wurden. Schmp. 103°C.

Elementaranalyse[++].

$C_{18}H_{20}O_5$ (316,3)

Ber. C = 68,34 ; H = 6,37 ;
Gef. C = 68,28 ; H = 6,63 .

8.) Zyklisierung von Flavokawin A zum Flavanon.

ca. 5 mg Flavokawin A wurden in einem Schliffkölbchen mit 10 ml 50 %igem Methanol und 50 mg wasserfreiem Natriumazetat 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde filtriert und mit dem Filtrat die folgenden Reaktionen durchgeführt :

+) K.WIMMER, in Houben-Weyl, Method.d.organ. Chem. Bd. IV, S.168, Thieme Stuttgart 1955

++) Analyt. Kontroll-Labor. der Fa.Schering A.G., Berlin

a) Reduktionsprobe nach SHINODA[1]:

3 ml des Filtrates der Reaktionslösung wurden mit Magnesiumpulver und einigen Tropfen konz. Salzsäure versetzt. Es bildete sich sofort ein erdbeerrotes Reduktionsprodukt.

b) Reduktionsprobe mit Kaliumborhydrid[2]:

3 ml des Filtrates der Reaktionslösung wurden mit 10 ml Methanol p.A. und einigen Kristallen Kaliumborhydrid versetzt. Es bildete sich sofort ein weinrotes Reduktionsprodukt.

9.) Papierchromatographie.

Für die papierchromatographische Untersuchung wurden Papiere der Fa.SCHLEICHER und SCHÜLL No. 2043 bM verwendet. Es wurde nach der aufsteigenden Methode chromatographiert, wobei die Papiere zu Zylindern geformt waren.

Als Laufmittel wurde 15 %ige Essigsäure benutzt. Die entwickelten Chromatogramme (Laufstrecke 20 cm) wurden getrocknet und die einzelnen Flecke unter der Purinlampe ($E_{max.}$ 260 mμ) markiert.

---

1) J.SHINODA, J.pharmac.Soc.Japan [YAKUGAKUZASSHI] 48, 214 (1928)

2) R.M.HOROWITZ, J.Org.Chem. 22, 1733 (1957)

10.) Prüfung auf Dioxymethylengruppen.

ca. 1 mg Flavokawin A wurde mit 3 ml Phosphorsäure (d = 1,7) in einem kleinen, oben zugeschmolzenen Fraktionierkölbchen langsam erhitzt. Das Destillat wurde getrennt in 7 verschiedenen Vorlagen tropfenweise aufgefangen.

Diese 7 Fraktionen wurden mit je 0,5 ml einer 72 %igen Schwefelsäure und einer Spatelspitze Chromotropsäure versetzt und 15 Min. in einem siedenden Wasserbad erhitzt. Die einzelnen Lösungen blieben nach dieser Zeit farblos = negatives Ergebnis.

Als Vergleichssubstanz diente Methysticin, dessen Molekül eine Dioxymethylengruppe enthält. Unter denselben Bedingungen färbte sich die Lösung violett.

11.) Alkalispaltung.

ca. 2 mg Flavokawin A wurden in einem Schliffkölbchen (20 ml) mit 5 ml einer 50 %igen wässrig-methanolischen Kaliumhydroxyd-Lösung gelöst und anschließend auf einem siedenden Wasserbad erhitzt bis der Alkohol verdunstet war. Der Rückstand wurde im Sandbad bei einer Temperatur von 180°C 3 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Der abgekühlte Rückstand wurde mit 2 n - H_2SO_4 angesäuert und dreimal mit je 20 ml Äther ausgeschüttelt, darauf der Äther mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und i.V. abdestilliert. Der Rückstand wurde mit wenig Methanol aufgenommen und im System Eisessig-Wasser (15 : 85 ; v/v) chromatographiert.

Vergleichssubstanz : p-methoxy-Benzoesäure.
Die Flecken wurden vor einer Purinlampe
E_{max} 260 mμ identifiziert.

Eigenschaften von Flavokawin B Schmp. 80 - 82°C.

1.) Löslichkeit.

Flavokawin B ist leicht löslich in Chloroform, Cyclohexan, n-Hexan und Benzol, schwerer in Methanol, Äthanol und Äther, praktisch unlöslich in Wasser.

2.) Farbreaktionen.

a) konz. H_2SO_4.
Flavokawin B löst sich in konz. H_2SO_4 mit tief orangegelber Färbung.

b) Eisenchloridreaktion.
3 ml einer 0,1 %igen methanolischen Flavokawin-B-Lösung färbten sich nach Zugabe von 1 Tropfen einer 1 %igen methanolischen Ferrichloridlösung braun mit einem roten Stich.

c) Zirkonoxychloridreaktion.
Methanolische $ZrOCl_2$-Lösung gibt eine Vertiefung des gelben Farbtones einer Flavokawin-B-Lösung.

3.) Elementaranalyse+).
Zur Analyse wurde die Substanz 24 Stunden im Vacuum über P_2O_5 getrocknet. Heizflüssigkeit: Methanol.

$C_{17}H_{16}O_4$ (284,3)

Ber. C = 71,82 ; H = 5,67 ; O = 22,51 ;
Gef. C = 71,75 ; H = 5,90 ; O++) 21,86 .

+) Analyt. Kontroll-Labor. der Fa.Schering A.G.,Berlin

++) Sauerstoff direkt bestimmt.

4.) IR-Absorptionsspektrum von Flavokawin B.

Das Spektrum von Flavokawin B wurde mit einem vollautomatischen BECKMANN IR-5-Spektrophotometer im Frequenzbereich von 4000 - 850 cm^{-1} in Chloroform aufgenommen.

Tabelle 3

Bandenfrequenz $[cm^{-1}]$

s	m	w
		3030
		2967
		2857
1631		
1590		
	1504	
	1473	
	1458	
	1429	
	1399	
1351		
	1309	
	1292	
	1250	
1164		
1117		1060
	1037	
		1002
	990	
	980	
		943
		893
		872
		837

s = starke
m = mittelstarke
w = schwache Banden

5.) Azetylierung.

52 mg Flavokawin B (Schmp. 80 - 82°C) wurden in wenig Pyridin gelöst und zu der intensiv gelb gefärbten Lösung 6 ml Essigsäureanhydrid gegeben. Nach 48 Stunden wurde die fast farblos gewordene Flüssigkeit mit 12 ml Wasser versetzt und für zwei Stunden in den Kühlschrank gestellt. Nach dieser Zeit hatten sich ganz schwach gelb gefärbte Kristalle abgeschieden, die abgesaugt und mit Äthanol nachgewaschen wurden. Es wurde aus heißem Äthanol umkristallisiert.

Ausbeute : 0,034 g Schmp. 133°C.

a) Elementaranalyse der Azetylverbindung.
Zur Analyse wurde die Substanz 24 Stunden bei 64°C im Vacuum über P_2O_5 getrocknet.

$C_{19}H_{18}O_5$ (326,2)

Ber. C = 69,92 ; H = 5,65 ;
Gef. C = 70,15 ; H = 5,71 .

6.) IR-Absorptionsspektrum von Flavokawin B-azetat.

Das Spektrum von Flavokawin B-azetat wurde mit einem vollautomatischen BECKMANN IR-5-Spektrophotometer im Frequenzbereich von 4000 - 850 cm^{-1} in Chloroform aufgenommen.

Tabelle 4

Bandenfrequenz $\left[cm^{-1}\right]$

s	m	w
		3534
		3030
		2941
		2857
1793		
1653		
1618		
1584		
	1502	
	1471	
	1429	
	1376	
1333		
	1314	
	1302	
	1282	
1215		
1157		
1099		
		1058
	1042	
	1032	
	1017	
	1000	
	990	
	978	
		950
		940
	889	
	833	

s = starke
m = mittelstarke
w = schwache Banden

UV-Absorptionsspektrum.

Die wasserfreien Substanzen wurden in Methanol p.A. MERCK gelöst und mit einem Spektralphotometer PMQ II der Fa. ZEISS gemessen. Die Schichtdicke der verwendeten Quarzküvetten betrug 1 cm.

Bei jeder Messung wurde die Absorptionsdifferenz der Eigenextinktion des Lösungsmittels berücksichtigt. Die Konzentrationen der Meßlösungen betrugen für:

Flavokawin A	0,9 mg / 100 ml
Flavokawin A-azetat	1,0 mg / 100 ml
Dihydroflavokawin A	1,5 mg / 100 ml
Flavokawin B	1,1 mg / 100 ml
Flavokawin B-azetat	1,5 mg / 100 ml.

Lebenslauf

Am 21. Juli 1929 wurde ich, Peter Philipp B ä h r als Sohn des Kaufmannes Hans Bähr und dessen Ehefrau Erika geb. Neuhoff, in Stutzhaus/ Thüringen, geboren.

Ostern 1936 wurde ich in die Volksschule in Ohrdruf/Thür. eingeschult. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich die Oberschule für Jungen in Ohrdruf/Thür. und konnte dort im Juli 1948 meine Reifeprüfung ablegen.

Im Juli 1951 begann ich meine praktische Ausbildung als Apothekerpraktikant, die ich in der Gustav-Freytag-Apotheke in Gotha im Juni 1953 mit dem Vorexamen abschloß.

Zum Wintersemester 1954/55 begann ich das Pharmazie-Studium an der Freien Universität Berlin, das ich nach bestandenem Staatsexamen im Herbst 1957 beendete. Die Approbation als Apotheker erhielt ich im Januar 1959.

Seit dem Jahre 1959 beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. H ä n s e l , Direktor des Institutes für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin.

Druck: Arno Brynda, Berlin 30